

Aus dem Experimental & Clinical Research Center
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Einfluss des Fettgehalts der Nahrung auf die Aktivität des Endocannabinoid-Systems gesunder schlanker und adipöser Menschen

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Anne-Christin Lehmann
aus Oranienburg

Gutachter/in:

1. Prof. Dr. med. J. Jordan
2. Prof. Dr. med. J. Spranger
3. Prof. Dr. rer. nat. J. Eckel

Datum der Promotion: 03.09.2010

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Hintergründe dieser Arbeit.....	1
1.2	Komponenten und Physiologie des Endocannabinoid-Systems	1
1.3	Metabolische Effekte der Endocannabinoide	6
1.4	Aktivierung des Endocannabinoid-Systems bei Adipositas	10
1.5	Fragestellung und Hypothese	12
2	Material und Methoden	13
2.1	Probandenauswahl	13
2.2	Studienverlauf	14
2.3	Diätetische Intervention	15
2.4	Blutuntersuchungen und Testmahlzeit	17
2.5	Indirekte Kalorimetrie	18
2.6	Anthropometrische Messungen	19
2.7	Blutdruck und EKG	20
2.8	Biopsien	21
2.9	Genexpressionsanalyse im Fettgewebe und im Skelettmuskel.....	23
2.10	Bestimmung von Anandamid im Plasma	27
2.11	Datenverarbeitung und statistische Analyse.....	29
3	Ergebnisse	31
3.1	Studienverlauf.....	31
3.2	Diätcompliance	32
3.3	Anthropometrische Daten	33
3.4	Einfluss der Ernährung auf Körpergewicht, Lipide und hs-CRP	34
3.5	Glukose, Insulin und Fettsäuren nach der Testmahlzeit.....	36
3.6	Anandamid.....	37
3.7	Genexpressionsanalyse in Fettgewebe und Skelettmuskel	39
4	Diskussion	42
4.1	Reflektion der Hypothese	42
4.2	Einfluss der Ernährung auf Anandamid	42
4.3	Nahrungseinfluss auf die Gene des Endocannabinoid-Systems.....	47
4.4	Stärken und Schwächen der ECSF-Studie.....	50
5	Zusammenfassung	54

Literaturverzeichnis	56
Anhang	63
Abkürzungsverzeichnis	63
Abbildungsverzeichnis.....	65
Tabellenverzeichnis.....	66
Erklärung	67
Lebenslauf.....	68
Tagungsbeiträge	69
Danksagung	70

1 Einleitung

1.1 Hintergründe dieser Arbeit

Das Wissen über die Heilwirkung der Pflanze *Cannabis sativa* ist Jahrtausende alt. Im Jahr 1964 gelang die Entdeckung des Hauptwirkstoffes, Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC) (1). Aber erst mit der Identifizierung der Cannabinoid-Rezeptoren und ihren endogenen Agonisten zu Beginn der neunziger Jahre rückte die Erforschung der endogenen Cannabinoide stärker in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen und medizinischen Interesses. Schon lange wird THC wegen seiner appetitanregenden und antiemetischen Wirkung in der Tumor- und Aids-Therapie eingesetzt (2). Seit vielen Jahren wird die Rolle der Endocannabinoide in der zentralen und peripheren Schmerzverarbeitung, bei der Immunabwehr, bei Entzündungsvorgängen, der Tumorentstehung und bei neurodegenerativen Erkrankungen intensiv untersucht (3). Neue Erkenntnisse zeigen, dass Endocannabinoide neben ihren zentralen Wirkungen auch wesentliche Funktionen im Stoffwechsel peripherer Organe haben. Die Entdeckung der Existenz eines körpereigenen Endocannabinoid-Systems (ECS) hat zur Untersuchung dieser peripheren Stoffwechselwirkungen angeregt. In verschiedenen Studien zeigte sich eine Fehlregulation des Endocannabinoid-Systems bei Adipositas und assoziierten Erkrankungen (4 - 7). Ein erhöhter Fettgehalt der Nahrung könnte eine Ursache für die (Über-)Aktivität des ECS bei übergewichtigen Menschen sein. Um diesen Zusammenhang näher zu untersuchen, wurde die ECSF-Studie (Endocannabinoid-System bei fettreicher Ernährung) durchgeführt, deren Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit dargestellt sind.

1.2 Komponenten und Physiologie des Endocannabinoid-Systems

Zunächst soll ein Überblick über die Funktion des menschlichen Endocannabinoid-Systems und seiner einzelnen Bestandteile sowie deren Synthese und Degradation gegeben werden. Das Endocannabinoid-System besteht aus den Cannabinoid-Rezeptoren, den Endocannabinoiden sowie den synthetisierenden und abbauenden Enzymen. Es stellt ein hochkomplexes und äußerst wichtiges, physiologisches System dar, das eine Reihe von Stoffwechselprozessen beeinflusst. Primäre Funktionen des ECS scheinen die Aufrechterhaltung der körpereigenen Homöostase und die Vermittlung der Erholung des Körpers von „Stress“ zu sein. Dazu greifen die Endocannabinoide in unterschiedliche Regulationssysteme ein und senken beispielsweise den Blutdruck, die Körpertemperatur, die Schmerz- und Angstwahrnehmung, regulieren Muskelspannung und Erregungsleitung im Gehirn und stimulieren Appetit und Belohnungsverhalten. Mit der Entdeckung der beiden Cannabinoid-Rezeptoren, CB₁ und CB₂, wurde die molekulare Basis für die Wirksamkeit von Δ^9 -THC erklärt und erstmals die Existenz

eines körpereigenen Cannabinoid-Systems postuliert (8, 9). CB_1 -Rezeptoren kommen in vielen Bereichen des Zentralen Nervensystems (ZNS) in großer Dichte vor und zählen zu den häufigsten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren im Gehirn. In geringerer Zahl finden sie sich auch in verschiedenen peripheren Organen (Abbildung 1).

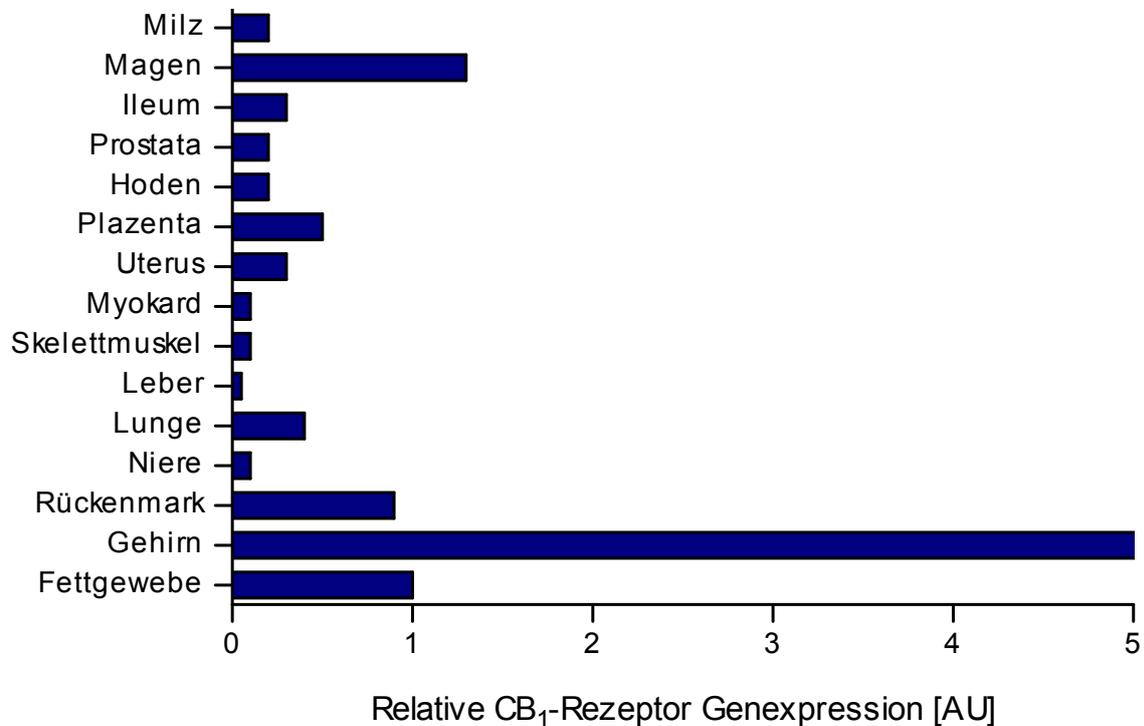


Abbildung 1: Quantifizierung der CB_1 -Rezeptor-mRNA in peripheren Organen des Menschen (4)

CB_2 -Rezeptoren werden vorrangig von Zellen des Immunsystems exprimiert und sind in geringer Dichte im Gehirn (Mikroglia, Stammhirn) und in den Keratinozyten der Haut nachweisbar (10). Wie die CB_1 -Rezeptoren gehören auch sie zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Ihre Aktivierung setzt eine Signalkaskade in Gang (Inhibierung der Adenylatzyklase, intrazelluläre Calciumfreisetzung, Hemmung des Kaliumausstroms), die schließlich zu einer Modulation der neuronalen Erregbarkeit führt (11) (Abbildung 2).

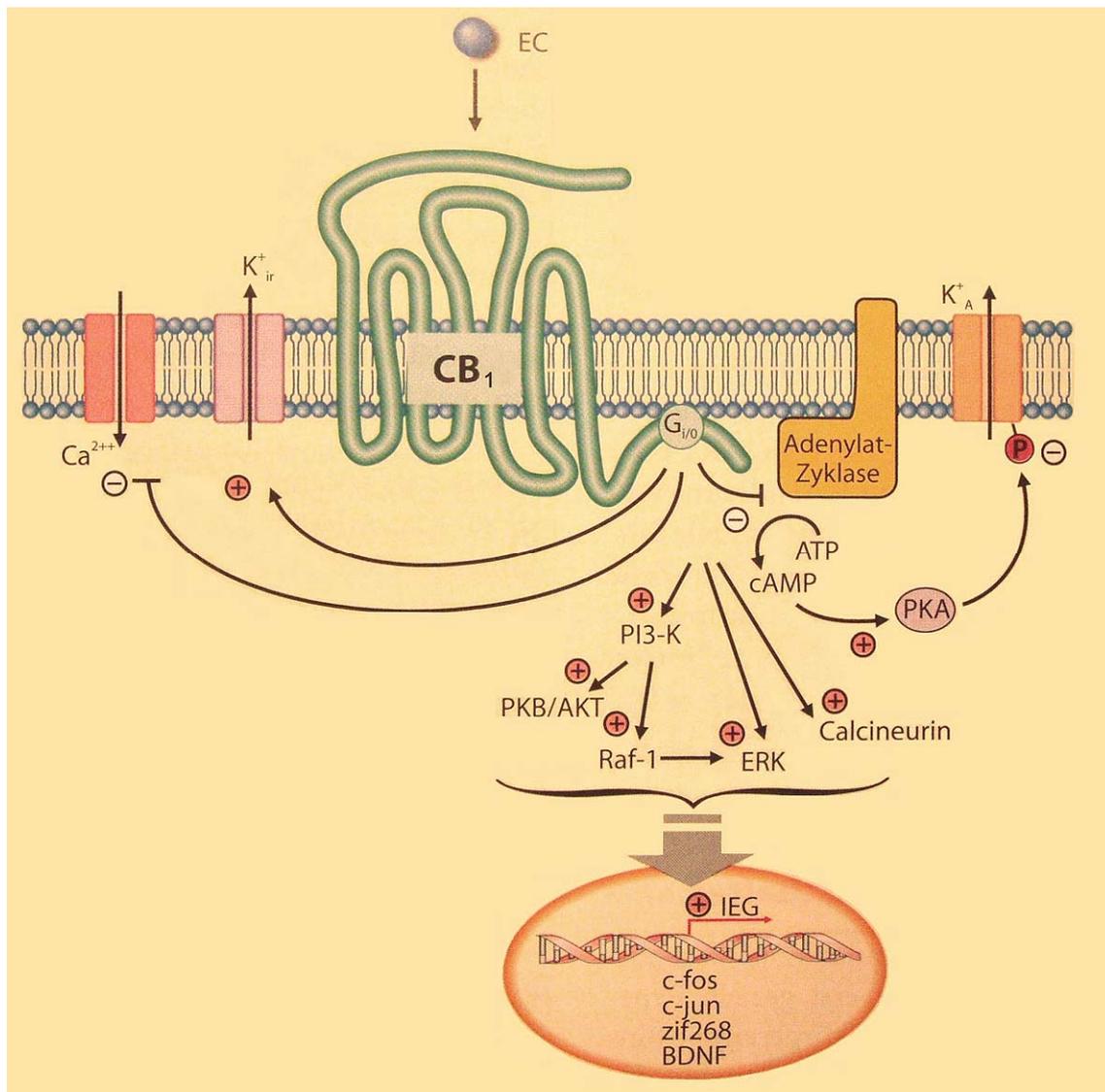


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Signaltransduktion des CB₁-Rezeptors

G_{i/o}: inhibitorisch wirkendes G-Protein, cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat, PKA: Protein Kinase A, PKB/AKT: Protein-Kinase B, PI3-K: Phosphoinositol-3-Kinase, Raf-1: Raf-1-Kinase, ERK: extrazellulär regulierte Kinase, IEG: immediate early gene, c-fos, c-jun, zif268: Transkriptionsfaktoren, BDNF: brain derived neurotrophic factor.

Mit freundlicher Genehmigung von Schusdziarra V, Azad SC, Erdmann J, et al. (12).

Im Gehirn wirken Endocannabinoide vorrangig als retrograde Transmitter (13, 14). Nach Depolarisation der Nervenzelle werden sie aus der postsynaptischen Membran freigesetzt, aktivieren CB₁-Rezeptoren in der präsynaptischen Membran und inhibieren dadurch die Freisetzung von Neurotransmittern wie GABA, Dopamin, Noradrenalin, Glutamat oder Serotonin (Abbildung 3).

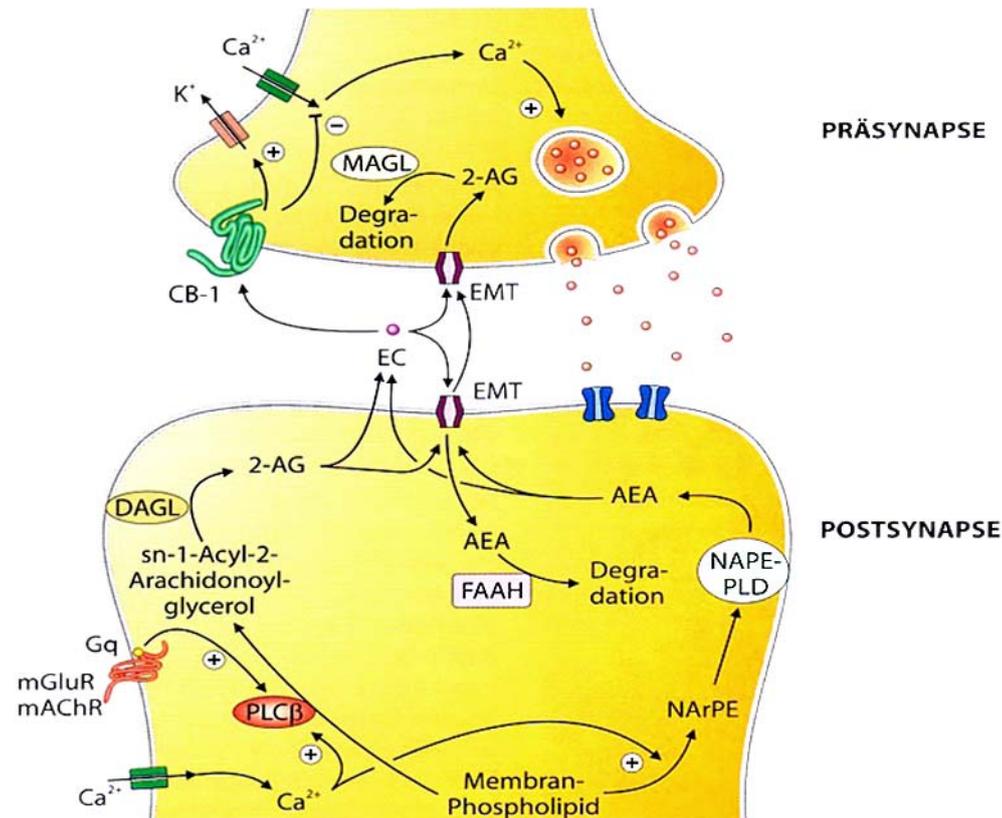


Abbildung 3: Retrograde Signaltransduktion durch CB₁-Rezeptoren im Gehirn

AEA: Anandamid, 2-AG: 2-Arachidonylglycerol, CB₁: Cannabinoid-Rezeptor Typ 1, DAGL: Diacylglycerol-Lipase, EC: Endocannabinoide, EMT: Endocannabinoid-Membran-Transporter, MAGL (= MGL): Monoglycerol Lipase, FAAH: Fatty Acid Amide Hydrolase, mAChR: muskarinischer Acetylcholin-Rezeptor, mGluR: metabotroper Glutamat-Rezeptor, NAPE-PLD: N-Alcyl-Phosphatidyl-Ethanolamin-Phospholipase D, NArPE (= NAPE): N-Arachidonyl-Phosphatidyl-Ethanolamin, PLCβ: Phospholipase Cβ, Gq: G-Protein q.

Mit freundlicher Genehmigung von Schusdziarra V, Azad SC, Erdmann J, et al. (12).

Endocannabinoide sind Arachidonsäure-Derivate, die ubiquitär im Organismus vorkommen. Arachidonsäure ihrerseits ist ein Derivat der Linolsäure, die zu den essentiellen mehrfach ungesättigten Fettsäuren gehört. Aufgrund ihrer guten Fettlöslichkeit können Endocannabinoide nicht wie andere Neurotransmitter in Vesikeln gespeichert werden, sondern werden bei Bedarf kurzfristig aus ihren inaktiven Vorstufen, den Phospholipiden der Zellmembran, synthetisiert und freigesetzt. Vorrangiger Trigger für die Endocannabinoid-Synthese ist ein Ca²⁺-Einstrom in die Zelle. Nach Rezeptoraktivierung werden die Endocannabinoide über spezielle Transportproteine rasch in die Zellen aufgenommen und dort enzymatisch abgebaut. Die bislang am besten untersuchten Endocannabinoide sind Anandamid (AEA, Arachidonylethanolamid) und 2-Arachidonylglycerol (2-AG) (3, 11, 14). Ihre jeweilige Synthese ist in Abbildung 4 schematisch dargestellt.

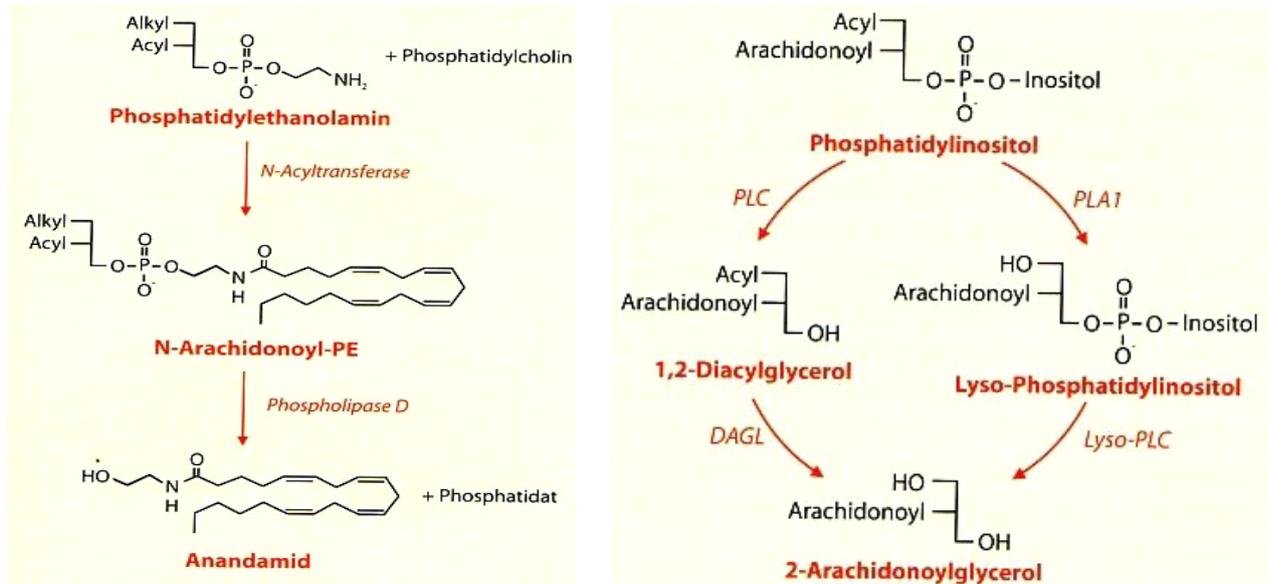


Abbildung 4: Synthese von Anandamid und 2-AG

PLC: Phospholipase C, DAGL: Diacyl-Glycerol-Lipase, PLA1: Phospholipase A1, Lyso-PLC: Lyso-Phospholipase C, PE: Phosphatidylethanolamin

Mit freundlicher Genehmigung von Schusdziarra V, Azad SC, Erdmann J, et al. (12).

Hauptgegenstand der Untersuchungen im Rahmen der ECSF-Studie war Anandamid. Es wird aus Arachidonsäure und Ethanolamin gebildet und kann alle THC-vermittelten Effekte auslösen. AEA kommt in hohen Konzentrationen im Hippocampus, Cortex, Thalamus und Cerebellum vor. Es bindet an CB₁- und CB₂-Rezeptoren, jedoch mit höherer Affinität zum CB₁-Rezeptor. Das im Gehirn am häufigsten vorkommende Endocannabinoid ist 2-Arachidonylglycerol, ein Ester aus Arachidonsäure und Glycerol. Als Zwischenprodukt des Lipidstoffwechsels erfüllt 2-AG sehr viele Funktionen. Daher ist es im Gehirn und in den peripheren Geweben in höheren Konzentrationen als AEA vorzufinden. 2-AG hat eine höhere Selektivität zum CB₁- und CB₂-Rezeptor als Anandamid.

Der Abbau von AEA und 2-AG erfolgt durch die intrazellulären Enzyme Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH) und Monoglycerol Lipase (MGL), die jeweils Arachidonsäure vom Molekülrest abspalten (15). FAAH und MGL sind ubiquitär im ZNS und in peripheren Geweben zu finden. Abbildung 5 zeigt die FAAH-Genexpression in peripheren Geweben des Menschen. In vitro können beide Enzyme Anandamid abbauen. In vivo allerdings zeigt sich bei FAAH Knock Out Mäusen, dass nur das infundierte Anandamid, nicht aber 2-AG, in seiner Wirkung verstärkt wird (16). Somit scheint der Abbau von 2-AG in vivo vor allem durch die MGL zu erfolgen.

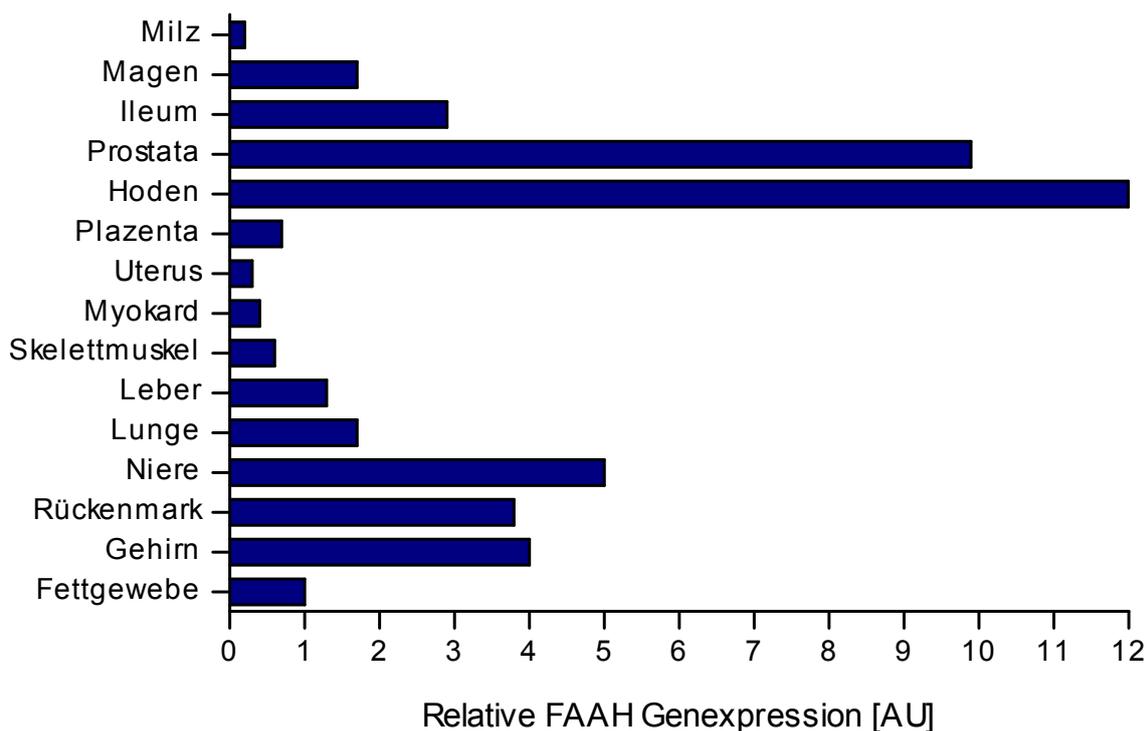


Abbildung 5: Quantifizierung der FAAH-mRNA in peripheren Organen des Menschen (4)

Mittels spezifischer natürlicher und synthetischer Agonisten und Antagonisten ließen sich die Mechanismen der Signaltransduktion am Cannabinoid-Rezeptor besser verstehen. Die erste klinisch getestete Substanz mit invers agonistischer Wirkung am CB_1 -Rezeptor war SR 141716A (Rimonabant). Anders als reine Antagonisten, die nur den Effekt des Agonisten blockieren, führt ein inverser Agonist zu einer gegenteiligen Wirkung am Rezeptor. Ob dabei der antagonistische oder invers agonistische Effekt überwiegt, hängt im Wesentlichen von der Konzentration reiner Agonisten ab. Ist diese groß, überwiegt die antagonistische Wirkung, fehlen reine Agonisten, entfaltet sich die invers agonistische Wirkung (17). Mit Taranabant (MK-0364) befand sich ein weiterer inverser CB_1 -Rezeptor-Agonist in der klinischen Forschung (18).

Im Folgenden werden einige Meilensteine der Endocannabinoid-Forschung auf zentraler und peripherer Ebene am Menschen und im Tiermodell dargestellt. Die beschriebenen metabolischen Wirkungen der Endocannabinoide erklären unter anderem, auf welcher Grundlage Rimonabant und Taranabant zur Behandlung der Adipositas entwickelt wurden.

1.3 Metabolische Effekte der Endocannabinoide

Komplexe Mechanismen steuern die Nahrungsaufnahme und den Energiestoffwechsel des Menschen (19). Vor allem der Hypothalamus und das limbische System sind die Zielstrukturen

der orexigenen Effekte der Endocannabinoide, denn hier entsteht die Motivation zur Nahrungsaufnahme und es erfolgt die Regulation von Hunger und Sättigung.

Periphere Endocannabinoide sind wichtige Regulatoren des Glukose- und Lipidstoffwechsels von Fettgewebe, Leber, Skelettmuskel und Pankreas (Abbildung 6).

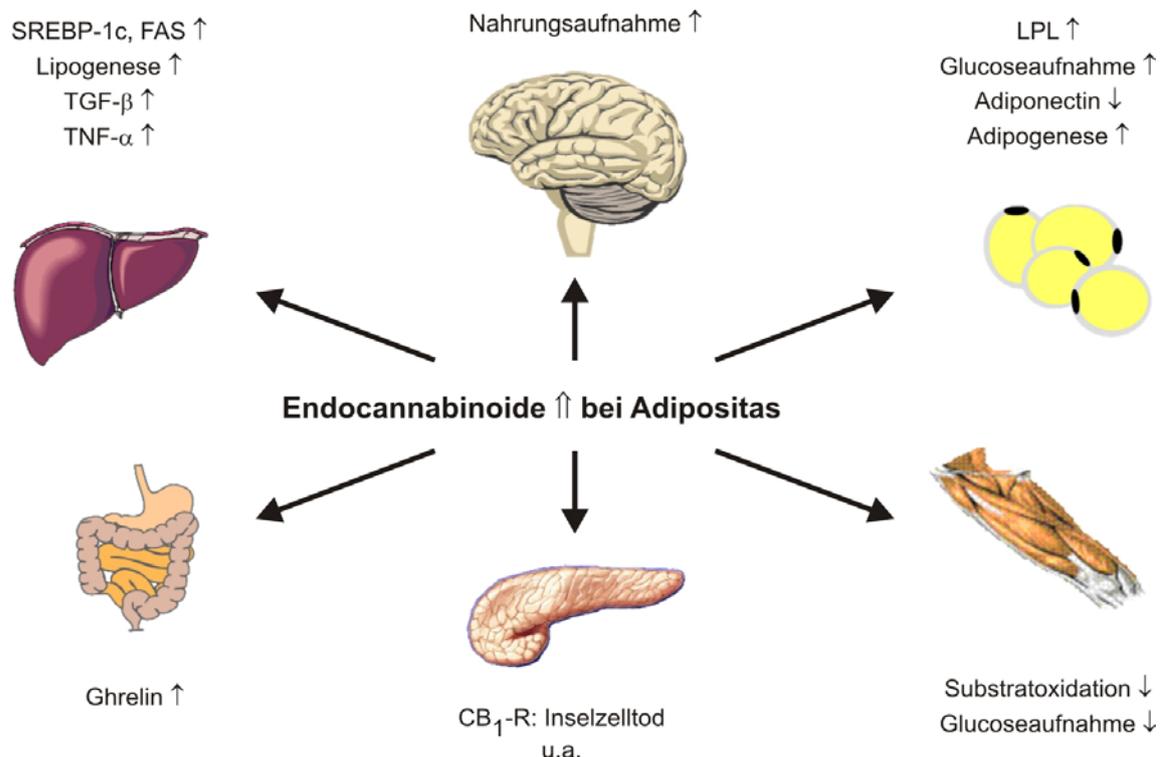


Abbildung 6: Metabolische Effekte des Endocannabinoid-Systems

FAS: Fettsäuresynthase, LPL: Lipoprotein-Lipase, SREBP-1c: Sterol-reguliertes Element bindendes Protein 1c, TGF-β: Transforming Growth Factor β, TNF-α: Tumornekrose Faktor α

Die Funktion des Endocannabinoid-Systems bei der zentralen Gewichtsregulation wurde unter anderem an Ratten untersucht. So stimulierte die zentrale Injektion von Anandamid in den Hypothalamus von Ratten die Nahrungsaufnahme durch Aktivierung von CB₁-Rezeptoren (20). Kirkham et al. untersuchten die Anandamid- und 2-AG-Konzentrationen im Gehirn von Ratten im Zustand des Fastens, während der Aufnahme wohlschmeckender Nahrung und nach Sättigung (21). Hierbei waren Anandamid und 2-AG im limbischen System während des Fastens erhöht und die 2-AG-Konzentration im Hypothalamus nahmen bei Nahrungsaufnahme ab. Bei direkter Injektion von 2-AG in den Nucleus accumbens wurde dosisabhängig die Nahrungsaufnahme gesteigert. Dieser Effekt konnte durch Rimonabant gehemmt werden.

Ravinet Trillou et al. untersuchten die Gewichtsentwicklung von CB₁ Knock Out Mäusen (CB₁^{-/-}) im Vergleich zum Wildtyp. Sie beobachteten, dass CB₁^{-/-}-Mäuse bei etwa gleicher täglicher Kalorienaufnahme unter Standard-Diät schlank blieben und bei fettreicher Ernährung keine Adipositas entwickelten. CB₁^{-/-}-Mäuse zeigten verminderte Leptin- und Insulinwerte und entwickelten keine Hyperphagie unter Hochfett-Diät (22). Auch bei Cota et al. wiesen CB₁^{-/-}-Mäuse aufgrund der geringeren Gesamtkörperfettmasse ein geringeres Körpergewicht als die Wildtyp-Tiere auf. Der schlanke Phänotyp der jungen CB₁^{-/-}-Mäuse wurde durch die geringere Nahrungsaufnahme begründet, wohingegen erwachsene CB₁^{-/-}- und Wildtyp-Mäuse gleich viel fraßen (23). Demnach kommt der CB₁-Rezeptor-Aktivierung eine Schlüsselrolle in der Entstehung ernährungsbedingter Adipositas zu. Die CB₁-Rezeptor-Blockade beeinflusst nicht nur die Nahrungsaufnahme, sondern auch periphere metabolische Prozesse, die schließlich zu einer Gewichtsreduktion führen.

Als erster und einziger CB₁-Rezeptor-Blocker wurde Rimonabant (SR141716) im Juni 2006 zur Behandlung von adipösen Patienten in Europa zugelassen. In den RIO-Studien („Rimonabant in Obesity“) wurde Rimonabant an mehr als 6600 übergewichtigen bzw. adipösen Patienten auf seine Wirksamkeit und Sicherheit untersucht (24 - 27). In den RIO-Studien führte Rimonabant unter entsprechender Diät innerhalb eines Jahres zu einer Gewichtsabnahme von 5 kg zusätzlich zur Gewichtsreduktion unter Placebo sowie zu einer Reduktion des Bauchumfanges von 4 cm, zu einer Verbesserung von HbA_{1c}, HDL-Cholesterin, Plasma-Adiponektin, Insulin, hoch-sensitivem CRP, Triglyceriden, small-dense LDL und Leptin. Wie schon im CB₁^{-/-}-Maus-Modell zeigt sich auch in den RIO-Studien, dass die Wirkungen von Rimonabant nicht ausschließlich durch die Stoffwechselverbesserung im Rahmen der Gewichtsreduktion zu erklären sind. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit physiologischen Studien zu den nachfolgend beschriebenen peripheren metabolischen Effekten des Endocannabinoid-Systems in Fettgewebe, Muskel und Leber. Aufgrund unerwünschter psychiatrischer Wirkungen musste Rimonabant im November 2008 vom europäischen Markt genommen und das gesamte Studien- und Entwicklungsprogramm gestoppt werden. Da Taranabant ein ähnliches Spektrum unerwünschter Wirkungen aufwies, wurden auch hier sämtliche Forschungsbemühungen eingestellt. Damit ist der Einsatz inverser Agonisten am CB₁-Rezeptor zur Adipositas-Therapie gescheitert. Neue Bemühungen richten sich nun auf die Entwicklung rein peripher wirkender CB₁-Rezeptor-Antagonisten (28).

Das Fettgewebe des Menschen und von Nagetieren verfügt über ein funktionierendes Endocannabinoid-System, es exprimiert aber als alleinigen Subtyp den CB₁-Rezeptor (4, 29 - 31). In der Literatur finden sich unterschiedliche Aussagen zur Cannabinoid-Rezeptor-Expression im Fettgewebe. Diese widersprüchlichen Ergebnisse sind am ehesten auf die Verwendung ungeeigneter Antikörper zurückzuführen (30).

In Adipozyten der Maus steigerte die Aktivierung des CB₁-Rezeptors die Lipoproteinlipase-Aktivität (23). Die Lipoproteinlipase ist für die Aufnahme von Fettsäuren aus triglyceridreichen Lipoproteinen in die Adipozyten besonders wichtig. In einer in vitro-Studie hemmte Rimonabant die Triglyceridsynthese in Maus-Prädipozyten: Zwar entwickelten die Prädipozyten im Laufe ihrer Differenzierung das Expressionsmuster reifer Fettzellen, sie synthetisierten und speicherten jedoch keine Triglyceride. Diese Ergebnisse verdeutlichen die CB₁-Rezeptor-vermittelten lipogenen Eigenschaften der Endocannabinoide im Fettgewebe (32). Die gesteigerte Glukoseaufnahme nach CB₁-Rezeptor-Stimulation in Adipozyten des Menschen weist ebenfalls auf die Bedeutung der Endocannabinoide für die Lipogenese hin, denn im Rahmen der Glykolyse entsteht Glycerol-3-Phosphat als Ausgangssubstanz für die Triglyceridsynthese (33). Weiterhin scheint die CB₁-Rezeptor-Blockade im weißen Fettgewebe der Maus die Neubildung von Mitochondrien zu steigern und den Sauerstoffverbrauch zu erhöhen (34).

Der Einfluss des Endocannabinoid-Systems auf den Leberstoffwechsel wurde in mehreren Studien analysiert. Die Aktivierung von CB₁-Rezeptoren steigert die Expression des Transkriptionsfaktors SREBP-1c. Dieser wiederum aktiviert die Gene der Acetyl-Coenzym-A-Carboxylase-1 und Fettsäuresynthase und fördert die hepatozelluläre Fettsäuresynthese. Unter fettreicher Diät stiegen Anandamid, die CB₁-Rezeptor-Dichte und der Triglyceridgehalt in der Leber an. Diese Veränderungen traten bereits vor Entwicklung einer manifesten Adipositas auf. CB₁-Rezeptor Knock Out Mäuse dagegen entwickelten bei fettreicher Fütterung keine Fettleber (35). Die Behandlung adipöser fa/fa Ratten mit Rimonabant hemmte die Ausbildung einer Fettleber und Leberfibrose. Diese Wirkungen waren assoziiert mit einer verminderten Expression von TNF- α und TGF- β in der Leber, erhöhten zirkulierenden Adiponectin-Konzentrationen und einer Reihe von verbesserten metabolischen Parametern, wie sie auch in den RIO-Studien beobachtet wurden (36). Eine weitere Arbeit über den leberzellspezifischen Knock Out des CB₁-Rezeptors bei Mäusen bestätigte diese Befunde: Die Entwicklung von Fettleber und Insulinresistenz bei fettreicher Ernährung war bei den Knock Out Tieren im Vergleich zum Wildtyp deutlich verringert, die Gewichtsentwicklung hingegen blieb unbeeinflusst (37). Die CB₁-Rezeptor-Aktivierung in der Leber führt also zu gesteigerter Lipogenese und trägt zur Fibrosierung nach metabolischem oder toxischem Leberschaden bei (38). Die Gewichtszunahme dagegen ist auf andere Stoffwechseleffekte der Endocannabinoide zurückzuführen. Dies spricht für ein komplexes Zusammenspiel der Endocannabinoid-vermittelten Effekte im Gehirn und in der Peripherie.

Der Einfluss des Endocannabinoid-Systems auf den Muskelstoffwechsel ist bislang wenig untersucht worden. Rimonabant erhöhte die Glukoseaufnahme und den Sauerstoffverbrauch des M. soleus von ob/ob Mäusen und verbesserte die Insulinsensitivität (39). In einer in vitro-

Studie wurden Muskelfasern schlanker und adipöser Probanden jeweils mit AEA und/oder dem CB₁-Antagonisten AM251 über 24 Stunden behandelt und der Einfluss des Endocannabinoid-Systems auf die Expression von vier wichtigen Genen des oxidativen Energiestoffwechsels untersucht. Zwar weisen die Ergebnisse auf eine Beeinflussung dieser Gene durch das Endocannabinoid-System hin, jedoch wurde nur eine sehr geringe Zahl von Proben untersucht. Außerdem traten die Effekte erst bei unphysiologisch hohen Konzentrationen der Substanzen auf (40). Eine weitere *in vitro*-Studie wies die Expression des CB₁-Rezeptor-Proteins in Skelettmuskelzellen des Menschen nach. In diesen Zellen hemmte Anandamid über CB₁-Rezeptoren die Insulin-stimulierte Glukoseaufnahme durch veränderte Phosphorylierung von Insulinsignalmolekülen (41).

1.4 Aktivierung des Endocannabinoid-Systems bei Adipositas

Viele genetische Tiermodelle der Adipositas beruhen auf Mutationen des Leptin-Gens (*ob/ob*-Mäuse) oder des Leptin-Rezeptor-Gens (*db/db*-Mäuse, *fa/fa*-Ratten). Untersuchungen der Endocannabinoide in diesen Tiermodellen zeigten sowohl im Hypothalamus als auch im Uterus dieser Tiere gesteigerte Anandamid- und 2-AG-Konzentrationen, aber eine unveränderte CB₁-Rezeptor-Zahl. Leptin reduzierte die Endocannabinoid-Konzentrationen in den untersuchten Geweben der *ob/ob* Mäuse (42, 43). Während im Hypothalamus kein Mechanismus der gesteigerten Endocannabinoid-Verfügbarkeit identifiziert werden konnte, zeigte sich im Uterus sowohl eine gesteigerte Aktivität der synthetisierenden Enzyme als auch eine verringerte Aktivität des Endocannabinoid-Membrantransports und der degradierenden Enzyme FAAH und MGL. Diese Veränderungen wurden durch Leptin wieder auf das Wildtyp-Niveau zurückreguliert (42). Damit beruhen die Befunde eher auf dem Leptin-Mangel als auf der Adipositas der Tiere. In weiteren Studien wurden in verschiedenen Geweben unterschiedliche Expressionen der CB₁-Rezeptor-mRNA gemessen. So war sie im *M. soleus* von *ob/ob*-Mäusen verringert (39), in der Niere von *fa/fa*-Ratten unverändert (44) und im subkutanen Fettgewebe von *fa/fa*-Ratten erhöht (45).

Diese Studien versuchten erstmals das periphere Endocannabinoid-System mit seinen einzelnen Aufgaben genauer zu charakterisieren, denn gerade die Rolle der Endocannabinoide im Energiestoffwechsel und ihre spezifischen Stoffwechsel-Interaktionen waren zu diesem Zeitpunkt noch weitgehend unbekannt. Weitere Erkenntnisse über die gesteigerte Aktivität des Endocannabinoid-Systems bei Adipositas brachten Studien am Modell der Diet-Induced Obesity (DIO), das den Bedingungen der Adipositas beim Menschen näher kommt als die genetischen Varianten. Im epididymalen Fettgewebe und im Pankreas von DIO-Mäusen fanden sich gesteigerte Endocannabinoid-Konzentrationen, wobei die Ursache in dieser Studie nicht untersucht wurde (31). Bei DIO-Ratten führte fettreiche Diät zu einer verminderten CB₁-

Rezeptor-Dichte in mehreren extrahypothalamischen Gehirnregionen. Als Ursache für die verminderte CB₁-Rezeptor-Expression wurde eine gesteigerte Verfügbarkeit von Endocannabinoiden in diesen Gehirnregionen angenommen, aber im Rahmen der Studie nicht gemessen (46). Besonders interessant sind Daten von DIO-Mäusen, bei denen bereits kurze Zeit nach Beginn der fettreichen Ernährung und noch vor Entwicklung der Adipositas gesteigerte Anandamid-Konzentrationen in der Leber nachgewiesen wurden. In dieser Studie konnte eindeutig die Verringerung der FAAH-Aktivität als Ursache der gesteigerten Anandamid-Verfügbarkeit identifiziert werden (35).

In der ersten Studie zur Adipositas des Menschen wurden bei adipösen Frauen signifikant erhöhte Konzentrationen von AEA und 2-AG im Blut und eine Verminderung der mRNA-Expression des CB₁-Rezeptors und der FAAH im subkutanen Fettgewebe gemessen (4). Dabei bestand eine signifikante Korrelation zwischen den zirkulierenden Endocannabinoid-Konzentrationen und der FAAH-Expression. Diese Überaktivität des Endocannabinoid-Systems wurde durch moderate Gewichtsreduktion nicht beeinflusst. Erhöhte 2-AG- und AEA-Konzentrationen im Blut lagen auch bei adipösen Diabetikern vor (31), darüber hinaus wiesen die gleichen Autoren auch erhöhte 2-AG-Konzentrationen im viszeralen Fettgewebe adipöser Patienten nach.

Blüher et al. und Côté et al. konnten zeigen, dass die Werte für zirkulierendes 2-AG nur dann erhöht sind, wenn die betreffenden Personen eine Akkumulation von viszeralem Fettgewebe aufwiesen. Bei gleichem BMI und gleichem Taillenumfang waren die 2-AG-Konzentrationen im Blut aber nicht erhöht, wenn nur das subkutane Fettgewebe vermehrt war (5, 7). Zusätzlich wurde in beide Studien eine Korrelation von zirkulierendem 2-AG mit Markern des Metabolischen Syndroms gefunden. Die CB₁- und FAAH-Gene wurden im viszeralen stärker als im subkutanen Fettgewebe exprimiert. Im viszeralen Fettgewebe korrelierten CB₁- und FAAH-mRNA negativ mit der viszeralen Fettmasse und der zirkulierenden 2-AG-Konzentration. Demnach ist abdominale Adipositas mit der Fehlregulation des Endocannabinoid-Systems, und dieses seinerseits mit weiteren metabolischen Störungen assoziiert. Da genetische Ursachen für die Dysregulation des Endocannabinoid-Systems weitgehend ausgeschlossen werden konnten (47 - 49), bleibt unklar, wodurch die Assoziation von abdominaler Adipositas und Überaktivität des Endocannabinoid-Systems bedingt ist. In der vorliegenden Arbeit wird die Nahrungsfettaufnahme als mögliche Ursache der Aktivierung des Endocannabinoid-Systems im Rahmen der Adipositas des Menschen betrachtet.

1.5 Fragestellung und Hypothese

In zahlreichen Studien konnte bei Adipositas eine (Über-)Aktivierung des ECS mit erhöhten Endocannabinoid-Konzentrationen in verschiedenen Geweben beobachtet werden. Diese erhöhte Verfügbarkeit von Endocannabinoiden könnte eine vermehrte Stimulation des CB₁-Rezeptors zur Folge haben, welche ihrerseits die beschriebenen metabolischen Veränderungen induzieren könnte. Derzeit gibt es noch keinen definitiv nachgewiesenen Mechanismus, der die gesteigerte Bioverfügbarkeit von Endocannabinoiden bei Adipositas erklären kann. Denkbar und durch experimentelle Daten aus Tiermodellen unterstützt, sind sowohl eine vermehrte Synthese als auch ein verminderter Abbau der Endocannabinoiden. So zeigen Daten aus verschiedenen Studien eine verminderte FAAH-Expression und/oder FAAH-Aktivität bei Adipositas oder unter Hochfett-Diät und erhöhte Anandamid-Konzentrationen in peripheren Geweben.

Auf der Grundlage der bis zu Beginn der ECSF-Studie verfügbaren experimentellen Daten ergibt sich für die vorliegende Arbeit folgende Hypothese:

Übergewicht und fettreiche Ernährung des Menschen führen zu einer gesteigerten Bioverfügbarkeit von Endocannabinoiden.

Zur Bearbeitung dieser Hypothese wurde die klinische Studie „Endocannabinoid-System bei fettreicher Ernährung (ECSF)“ durchgeführt, in der der Fettgehalt der Nahrung bei schlanken und übergewichtigen Probanden modifiziert und der daraus resultierende Einfluss auf das Endocannabinoid-System beobachtet wurde.

Die Zielparameter waren:

1. Bestimmung von Anandamid im Blut vor und nach einer Testmahlzeit nach jeweils zweiwöchiger fettarmer bzw. fettreicher Ernährung
2. Entnahme von Fett- und Muskelgewebe zur Bestimmung der Expression von Genen des Endocannabinoid-Systems nach jeweils zweiwöchiger fettarmer bzw. fettreicher Ernährung

2 Material und Methoden

2.1 Probandenauswahl

Die Probandenrekrutierung begann im November 2006 über die Datenbank des Franz-Volhard-Centrums für Klinische Forschung sowie über Anzeigen in der Tagespresse, über Aushänge in medizinischen Einrichtungen der Charité und in Fitness-Studios. Die erste Probandin wurde im Dezember 2006 in die Studie eingeschlossen, die letzte im Juli 2007. Alle Untersuchungen fanden im Franz-Volhard-Centrum für Klinische Forschung am Experimental & Clinical Research Center statt. Die ECSF-Studie wurde am 19.10.2006 von der Ethikkommission der Charité in Mitte genehmigt (Antragsnummer: EA3/024/06).

Zunächst wurden die Studieninteressenten ausführlich über Studienziel, Ablauf, eventuelle Risiken, Datenschutz und Probandenversicherung aufgeklärt. Zusätzlich wurde ihnen die schriftliche Patienteninformation ausgehändigt. Nach Beantwortung aller Fragen durch den Prüfarzt und ausreichender Bedenkzeit unterschrieben die Probanden die Einverständniserklärung. Anschließend erfolgte die Screening-Untersuchung mit Anamneseerhebung, körperlicher Untersuchung, Messung des Blutdruckes, der Herzfrequenz, des Body Mass Index (BMI), des Taillenumfanges, Ableitung eines Elektrokardiogrammes (EKG) sowie Abnahme der Routine-Laborwerte zur Überprüfung der Ein- und Ausschlusskriterien. Lagen keine Ausschlussgründe vor, erhielten die Probanden bei Visite 1 eine pseudonymisierte Studiennummer, unter der alle Eintragungen im Dokumentationsbogen erfolgten.

Einschlusskriterien

- Alter: 18 bis 60 Jahre
- $BMI \leq 25 \text{ kg/m}^2$ und Taillenumfang $\leq 94 \text{ cm}$ (Männer) oder $\leq 80 \text{ cm}$ (Frauen)
- $BMI \geq 30 \text{ kg/m}^2$ und Taillenumfang $\geq 102 \text{ cm}$ (Männer) oder $\geq 88 \text{ cm}$ (Frauen)
- Verständnis der schriftlichen und mündlichen Aufklärung
- Schriftlich erklärtes Einverständnis
- Absetzen sämtlicher Begleitmedikation während der Stabilisierungs- und Interventionsphase ist aus ärztlicher Sicht möglich
- Anwendung zweier nicht-medikamentöser Maßnahmen zur Schwangerschaftsverhütung; als nicht gebärfähig galten Frauen mit Hysterektomie oder mindestens einjährigem Ausbleiben der Regelblutung

Ausschlusskriterien

- Jede unerlaubte Komedikation, die nicht ab Tag 0 abgesetzt werden kann
- Gleichzeitige Teilnahme an einer anderen Studie; Teilnahme an einer Studie, die weniger als zwei Monate vor dem Screening beendet wurde
- Unfähigkeit, die mündliche und schriftliche Aufklärung zu verstehen
- Einwilligungsunfähige oder minderjährige Personen und Probanden, die in familiärer oder finanzieller Abhängigkeit zum Studienleiter oder einem der Prüfärzte standen
- Diabetes mellitus Typ 1 oder 2; familiäre Fettstoffwechselstörungen
- Herzinsuffizienz NYHA II-IV; TIA oder Schlaganfall
- Symptomatische/nachgewiesene koronare Herzkrankheit oder Herzklappenfehler
- Blutdruck >160/90 mmHg beim Screening unbehandelt oder >140/85 mmHg behandelt
- Symptomatische oder nachgewiesene periphere arterielle Verschlusskrankheit
- Lebererkrankung, Cholestase (Transaminasen oder γ -GT mehr als 2-fach erhöht)
- Bekannte Niereninsuffizienz oder Serum-Kreatinin über Normalwert
- Ödeme als Hinweis auf Herzinsuffizienz, Leber- oder Nierenerkrankung
- Thrombozyten < 100.000, PTT oder INR erhöht
- Gewichtsveränderungen > 3 kg in den letzten drei Monaten; bariatrische Operation
- Schwangerschaft und Stillzeit, aktueller Kinderwunsch
- Autoimmunerkrankung; Organtransplantation; maligne Tumorerkrankung
- Alkohol- und Drogenabhängigkeit; psychiatrische Erkrankungen

2.2 Studienverlauf

Fünf Visiten waren im zweiwöchigen Rhythmus vorgesehen. Tabelle 1 zeigt das Visitenschema und die Inhalte der einzelnen Untersuchugstage. Die Visiten 2 und 4 dienten der Vorbereitung der Probanden auf die fettmodifizierten Phasen und der Kontrolle der Einschlusskriterien. Die Visiten 3 und 5 am Ende der fettarmen oder fettreichen Ernährungsphasen waren im Ablauf identisch und dienten der Charakterisierung der Wirkungen der Ernährungsmodifikation (Tabelle 1). Zwischen den beiden fettmodifizierten Ernährungsphasen lag eine Stabilisierungsphase von zwei Wochen, in der sich die Probanden wie gewohnt mit ca. 30% Fettanteil an der täglichen Kalorienmenge ernähren sollten. Die Reihenfolge der fettreichen und fettarmen Phasen wurde jedem Probanden zufällig zugeordnet. Jeder Proband bekam eine Aufwandsentschädigung von 300 € für die erfolgreiche Teilnahme an der Studie.

Tabelle 1: Visitschema und Inhalte der einzelnen Untersuchungstage

	S	V1	V2	V3	V4	V5	FU
Nüchtern	x	x	x	x	x	x	
Einverständnis	x						
Anamnese	x						
Körperliche Untersuchung	x			x		x	(x)
BMI, Taillenumfang	x	x	x	x	x	x	
BodPod[®], Bioimpedanzmessung				x		x	
Blutdruck, Herzfrequenz	x	x	x	x	x	x	(x)
Elektrokardiogramm	x			x		x	(x)
Routine-Blutentnahme	x		x	x	x	x	(x)
Abfrage der Adverse Events		x	x	x	x	x	x
Absetzen der Begleitmedikation		x					
Einsetzen der Begleitmedikation						x	
Ernährungsberatung	x	x	x	x	x	x	
Ernährungsprotokoll Ausgabe	x	x	x	x	x		
Ernährungsprotokoll Analyse		x	x	x	x	x	
Indirekte Kalorimetrie		x		x		x	
Fettgewebe- und Muskelbiopsie				x		x	
Testmahlzeit und Blutentnahmen				x		x	

2.3 Diätetische Intervention

Der Ernährungsberatung kam während der Studie eine besonders wichtige Rolle zu. Sie wurde von der Diätassistentin EB/DGE des Franz-Volhard-Centrums für Klinische Forschung durchgeführt und umfasste eine kontinuierliche Begleitung der Probanden in den einzelnen Ernährungsphasen sowie eine individuelle Anleitung zur Ernährungsumstellung. Das Führen der Ernährungsprotokolle, die gezielte Auswahl der Lebensmittel und das Zählen von Fettpunkten anhand einer Broschüre (Fettkonto) erforderte die aktive Mitarbeit der Studienteilnehmer. Da die Studie den Einfluss fettreicher Nahrung auf die Regulation des peripheren Endocannabinoid-Systems untersuchte, waren insgesamt drei Ernährungsphasen zu durchlaufen, in denen der tägliche Nahrungsfettanteil an der Gesamtkalorienmenge jeweils

15%, 30% oder 45% betrug. Die normale Verteilung der Makronährstoffe an der täglichen Gesamtkalorienzahl soll laut Deutscher Gesellschaft für Ernährung 30% Fett, 55% Kohlenhydrate und 15% Proteine betragen (50). Tabelle 2 zeigt die prozentuale Verteilung der Makronährstoffe an der täglichen Gesamtkalorienaufnahme, wie sie den Probanden für die fettmodifizierten Phasen vorgegeben wurde:

Tabelle 2: Verteilung der Makronährstoffe auf die tägliche Kalorienaufnahme

	Kohlenhydrate	Proteine	Fette
Fetteiche Phase	38%	17%	45%
Fettarme Phase	68%	17%	15%

Die tägliche Gesamtkalorienmenge sollte dabei konstant (isokalorisch) bleiben, um Gewichtsschwankungen zu vermeiden. Zur Bestimmung der, für die Gewichtskonstanz notwendigen, täglichen Kalorienaufnahme wurden die Ergebnisse der indirekten Kalorimetrie aus Visite 1 und die errechneten Werte aus dem ersten geführten Ernährungsprotokoll (vor Visite 1) herangezogen.

Die Probanden erhielten zu Visite 2 und 4 jeweils 150 ml Erdnussöl, um während der fettmodifizierten Phasen eine ausreichende Versorgung mit Arachidonsäure, dem notwendigen Baustein für die Endocannabinoid-Synthese, zu gewährleisten. Allen Probanden wurde empfohlen, der Hauptmahlzeit täglich einen Esslöffel Erdnussöl hinzuzufügen (entsprechend 190 mg Arachidonsäure).

Sämtliche Ernährungsprotokolle waren über sieben aufeinander folgende Tage zu führen. Die Auswertung erlaubte Rückschlüsse auf Ernährungsgewohnheiten, Verteilung der Makronährstoffe und tägliche Gesamtkalorienmenge. Nach Einschluss erhielten die Probanden das erste siebentägige Ernährungsprotokoll und einen Ernährungsfragebogen zur Erfassung ernährungsbezogener individueller Daten wie Essverhalten, Diäten, Lebensmittelallergien, Nahrungsmittelvorlieben und -abneigungen. Bei Visite 1 wurde das Ernährungsprotokoll ausgewertet, die Probanden bekamen Hinweise zum Führen des nächsten Protokolls und wurden nochmals auf die notwendige Gewichtsstabilität während der Studie hingewiesen. Der Zeitraum von Visite 1 bis 2 stellte eine zweiwöchige Stabilisierungsphase dar, in der die Probanden das zweite Ernährungsprotokoll führten und ihre Ernährung nicht mehr verändern sollten. Während der Visiten 2 und 4 wurde die Ernährung in der jeweiligen fettmodifizierten Phase erklärt. Zwischen den Interventionen lag eine zweiwöchige Stabilisierungsphase, in der eine normale Ernährung mit 30% Fettanteil an der täglichen Kalorienaufnahme angestrebt wurde.

Dem randomisierten cross-over Studiendesign entsprechend erhielt jeder Proband einen Musterernährungsplan für die jeweilige fettmodifizierte Phase, der auf Basis des ersten Ernährungsprotokolls erstellt worden war und die individuellen Ernährungsgewohnheiten berücksichtigte. Der Musterernährungsplan gab eine Orientierung über Mengen und Art der Lebensmittel, die gegessen werden sollten, um den entsprechenden Fettanteil und die tägliche Gesamtkalorienmenge zu erreichen. Durch die ausführliche Ernährungsberatung und entsprechendes Informationsmaterial (Broschüre „Fettkonto“) lernten die Probanden den Fettgehalt in verschiedenen Lebensmitteln einzuschätzen und konnten somit in Verbindung mit dem Musterernährungsplan für jede Fettphase ihre Ernährung selbständig gestalten und kontrollieren. Die Auswertung der Ernährungsprotokolle und die Zusammenstellung der Ernährungspläne erfolgte anhand des Computerprogramms OptiDiet Version 3.1.0.004. Es wurden insbesondere die tägliche Kalorienaufnahme sowie der Anteil von Proteinen, Kohlenhydraten, Fetten und Arachidonsäure an der Nahrung berechnet.

2.4 Blutuntersuchungen und Testmahlzeit

Blutentnahmen (BE) wurden als Routine-Blutentnahmen zur Verlaufskontrolle und im Rahmen der Testmahlzeit durchgeführt. Es wurden Vacutainer der Firma Becton-Dickinson verwendet. Bei Visite 3 und 5 wurde zur Blutentnahme jeweils eine Venenverweilkanüle gelegt, ansonsten erfolgte die Abnahme mittels Butterfly. Routine-Blutentnahmen erfolgten zum Screening, zu Visite 2 und 4 sowie bei der Baseline-Blutentnahme vor der Testmahlzeit. Es wurden folgende Parameter untersucht: Glukose, Insulin, Gesamt-Cholesterin, HDL, LDL, Triglyceride, ALT, AST, γ -GT, Na^+ , K^+ , Kreatinin, Harnstoff und kleines Blutbild. Die Gerinnungsparameter INR und PTT wurden beim Screening und bei Visite 4 ermittelt. Alle genannten Parameter wurden im Labor 28 (Mecklenburgische Straße 28, 14197 Berlin) bestimmt.

Die Testmahlzeit wurde jeweils am Ende der beiden Interventionsphasen nach 12-stündigem Fasten als Frühstück eingenommen. Der Kaloriengehalt betrug 5 kcal/kg Körpergewicht, die Zusammensetzung entsprach dem Fettgehalt der jeweiligen Diätphase (Tabelle 2) und wurde dem Körpergewicht des Probanden entsprechend individuell berechnet und zubereitet. Die Probanden hatten 15 min Zeit zum Verzehr. Bei fast allen Probanden bestand die Mahlzeit aus den gleichen Lebensmitteln. Alternativen bei Abneigung gegenüber bestimmten Lebensmitteln waren z. B. Salami anstelle von Käse oder Frischkäse, Butter statt Margarine. Fettarme Phase: Vollkornbrot, Tomatenmark oder Senf, Halbfettmargarine, fettarmer Käse (30% Fett i. Tr.), Eisbergsalat, Orangensaft (100% Fruchtanteil). Fettreiche Phase: Vollkornbrot, Butter/Halbfettmargarine, Frischkäse oder Schnittkäse (45% Fett i. Tr.) Eisbergsalat, stilles Mineralwasser.

Die Baseline-Blutentnahme wurde unmittelbar vor Beginn des Testessens durchgeführt, anschließend folgten vier weitere Blutentnahmen jeweils 30, 60, 90 und 120 min nach Beginn der Testmahlzeit. Der Proband lag oder saß dabei ruhig im Bett. Während der entnahmefreien Zeit wurden 500 ml NaCl 0,9% (Firma Fresenius Kabi Deutschland) zum Spülen des venösen Zugangs infundiert. Zu jedem Zeitpunkt wurden zirkulierende Endocannabinoide, Glukose, Insulin, freie Fettsäuren und hs-CRP (nur basal) bestimmt. Alle Blutröhrchen wurden sofort nach Entnahme bei 4°C für 10 min bei 2500 × g zentrifugiert und dann aliquotiert (Lagerung der Aliquots bei -20°C).

2.5 Indirekte Kalorimetrie

Für die Berechnung des individuellen täglichen Kalorienbedarfs war die Kenntnis des Energieumsatzes der Probanden im Ruhe-Nüchternzustand in Verbindung mit den Angaben aus dem Ernährungsprotokoll des Probanden bei Visite 1 erforderlich. Mit dem Verfahren der indirekten Kalorimetrie ließ sich der Energieumsatz zuverlässig bestimmen. Bei der 45-minütigen Messung wird der Sauerstoffverbrauch bzw. die Kohlendioxidproduktion als indirektes Maß für den Energieumsatz gemessen. Dazu liegt der Proband im Bett unter einer Atemhaube, über die Raumluft zugeführt und Atemluft abgeleitet wird (Abbildung 7; DeltatracII, Datex Ohmeda, Duisburg). In Raum- und Atemluft wird der Sauerstoff- bzw. Kohlendioxidgehalt analysiert und aus den jeweiligen Differenzen der Sauerstoffverbrauch und die Kohlendioxidproduktion und daraus der Ruheenergieumsatz berechnet. Die Untersuchung ist für den Probanden risikolos, gelegentlich wird das relativ lange, möglichst bewegungslose Liegen als anstrengend empfunden.



Abbildung 7: Indirekte Kalorimetrie – Probandin unter der Atemhaube

2.6 Anthropometrische Messungen

Die anthropometrischen Daten wurden immer durch den gleichen Untersucher und mit den gleichen Geräten erhoben. Die Körpergröße wurde einmalig bei der Screening-Visite mit einem automatisierten Höhenmessgerät (Firma Soehnle) in aufrechtem Stand des Probanden ohne Schuhe ermittelt. Die Bestimmung des Körpergewichts erfolgte morgens nach mindestens 10 Stunden Nahrungskarenz des Probanden auf einer geeichten, TÜV-geprüften Waage. Der Body Mass Index berechnet sich durch $BMI = \text{Körpergewicht [kg]} / (\text{Körpergröße [m]})^2$.

Die Messung des Taillenumfangs erfolgte am stehenden, entkleideten Probanden. Das Maßband wurde waagrecht in der Mitte des Abstandes zwischen Spina iliaca anterior superior und dem unteren Rippenbogen angelegt.

Zur Ermittlung der Körperzusammensetzung kamen zwei Verfahren zur Anwendung. Die bioelektrische Impedanzanalyse (BIA) wurde mit dem Quad Scan 4000 der Firma Bodystat® Ltd. (Isle of Man, GB) durchgeführt. Als nicht-invasives Verfahren mit hoher Aussagequalität misst die BIA den elektrischen Widerstand (Impedanz), den ein Wechselstrom von 0,8 mA, 50 kHz im Körper erfährt und ermöglicht auf einfache Weise Aussagen zur Körperkomposition, zu Ernährungszustand, Wasserhaushalt und physischer Fitness eines Probanden. Das Verfahren nutzt die unterschiedliche elektrische Leitfähigkeit von Körperflüssigkeiten, Knochen, Muskel und Körperfett. Je nach Wassergehalt der verschiedenen Kompartimente des Körpers erfolgt eine unterschiedlich gute Leitung des Wechselstroms. Durch den Elektrolytanteil sind Körperflüssigkeiten hervorragende Leiter für elektrischen Strom; Zellen wirken durch ihre Lipoproteinschicht in der Membran wie Kondensatoren, Muskelgewebe leitet relativ gut, während Fett sich wie ein Nichtleiter verhält. Aus den gemessenen Widerständen wird unter Berücksichtigung der Probandendaten (Geschlecht, Alter, Größe, Gewicht, Taillen- und Hüftumfang, tägliche Aktivität) über Algorithmen die Körperzusammensetzung berechnet. Zur Messung wurden jeweils zwei Elektroden am linken Hand- und Fußrücken des Probanden platziert, Arme und Beine berührten sich dabei nicht. Das Ergebnis war nach etwa 30 s ablesbar.

Die Ganzkörper-Densitometrie ist ein leicht durchführbares und zuverlässiges Verfahren zur Bestimmung der Körperzusammensetzung. Die Densitometrie ermittelt die Ganzkörper-Dichte (Körperdichte = Körpermasse [kg]/Körpervolumen [l]). Bei bekannter Dichte eines Körpers lassen sich daraus die relativen Anteile von Fett- und fettfreier Masse an der Gesamtkörpermasse errechnen (51). Da die fettfreie Masse (Muskel- und Knochenmasse) dichter als Fett ist, bedeutet eine niedrigere Dichte auch einen höheren Körperfettanteil. Die Körpermasse wurde zuvor mit einer geeichten Präzisionswaage ermittelt. Das Körpervolumen lässt sich mit dem BodPod® (Life Measurement Inc., Concord, USA) bestimmen (Abbildung 8).



Abbildung 8: BodPod® zur Messung der Körperzusammensetzung

Der eiförmige BodPod® besteht aus einer Referenzkammer und einer Messkammer, in der der Proband sitzt. Beide Kammern sind mit Umgebungsluft gefüllt und durch ein Diaphragma getrennt. Plethysmographisch wird durch Luftverdrängung in wenigen Minuten das Körpervolumen ermittelt und daraus die Dichte berechnet. Vor jeder Probandenmessung wurde die Messkammer mittels eines Testzylinders geeicht. Die Probanden trugen körpernahe Unterwäsche oder Badekleidung und eine Badekappe, um störende Widerstände während der Messung zu vermeiden. Es wurden jeweils zwei Messungen durchgeführt. Beide dauerten jeweils eine Minute, das Ergebnis lag unmittelbar nach Messende vor.

2.7 Blutdruck und EKG

Blutdruck und Herzfrequenz wurden im Sitzen nach 10 min Ruhe mit einem automatischen Messgerät bestimmt (Dinamap, Firma Critikon). Bei der Screening-Visite wurde der Studienarm (Arm mit den höheren Messwerten) und die Manschettenbreite (24 - 32 cm Armumfang: 14 cm-Manschette, 33 - 41 cm Armumfang: 16 cm-Manschette) für alle weiteren Messungen während der Studie festgelegt. Im Abstand von 3 min wurden fünf Messungen durchgeführt und jeweils aus den letzten drei Messergebnissen der Mittelwert von RR und HF bestimmt. Jede Ableitung des 12-Kanal-EKG erfolgte im Liegen mit dem Gerät BIOSET 9000 der Firma Hörmann

Medizinelektronik. Der Ausdruck wurde mit Probandendaten, Datum und Visitennummer versehen und sofort befundet.

2.8 Biopsien

Die Entnahme von Fett- und Muskelgewebe erfolgte mittels subkutaner Nadelbiopsie. Diese Technik ist ein etabliertes Verfahren im Franz-Volhard-Centrum für Klinische Forschung. Sie erlaubt durch ein wenig traumatisches Verfahren die Entnahme von 0,5 bis 1,0 g Fettgewebe und dauert etwa 15 min. Durch die geringe Traumatisierung ist diese Methode zur mehrfachen Entnahme im Rahmen von Interventionsstudien gut geeignet. Zunächst wurde die Haut lateral und etwas distal des Bauchnabels desinfiziert und mit einem sterilen Lochtuch abgedeckt. Darauf folgte eine Lokalanästhesie von etwa 2 × 2 cm Bauchhaut mit 3 ml Xylocitin-loc 1% (Lidocainhydrochlorid). Mittels Strauss-Kanüle und einer 10 ml-Spritze wurden danach unter sterilen Bedingungen etwa 4 bis 5 ml NaCl 0,9% injiziert und unter Bewegung zusammen mit Fettgewebestückchen wieder aspiriert (Abbildung 9). Der Spritzeninhalt wurde unmittelbar danach in ein 14 ml Zentrifugationsröhrchen überführt und mit 500 IE Heparin/ml NaCl aufgefüllt (Ratiopharm®). Dieser Vorgang wurde solange wiederholt, bis eine ausreichende Fettgewebemenge von etwa 1 g erreicht war. Das Fettgewebe wurde nach Ende der Biopsie sofort zur Weiterverarbeitung ins Adipozytenlabor gebracht, wo es nach mehreren Waschvorgängen eingefroren wurde. Die noch im Bauchfettgewebe verbliebene Kochsalzlösung wurde herausgedrückt und die Inzisionsstelle mit einer sterilen Kompresse und einem Pflaster verschlossen.

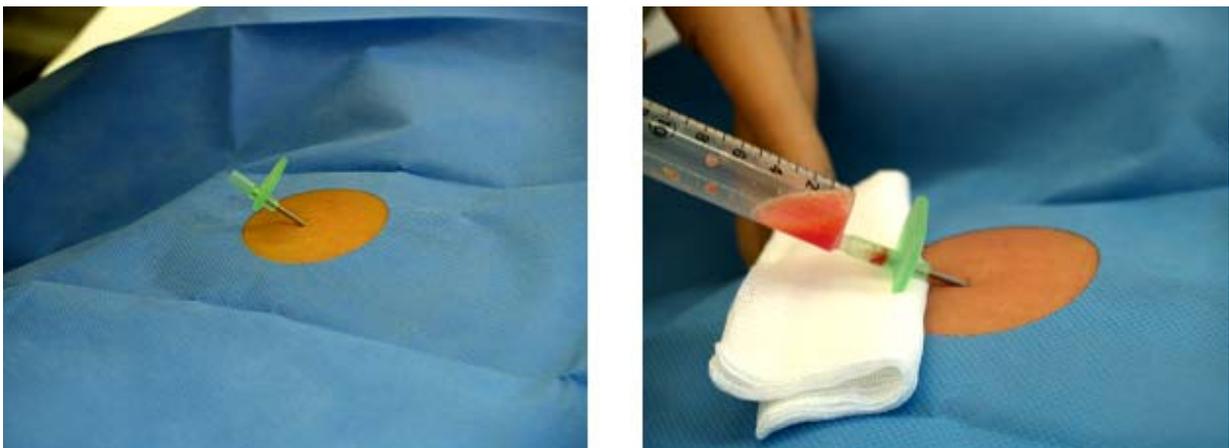


Abbildung 9: Fettgewebebiopsie

Die Muskelbiopsie wurde zunächst mittels Bergström-Nadel durchgeführt. Das Verfahren war aufgrund unpraktischer Handhabung des Systems jedoch ungeeignet, weshalb nach einer Alternativmöglichkeit gesucht wurde. Künftig wurden Stanz-Biopsienadeln der Firma SOMATEX

(Biopsie-Handy, Teltow) mit einem Durchmesser von 2,1 mm und einer Länge von 100 mm verwendet. Das Vorgehen der Probenentnahme änderte sich dabei nicht. Der Proband lag entspannt in Rückenlage, die Kniegelenke wurden mit einer Rolle stabilisiert. Nach Markierung der Biopsiestelle am Übergang vom unteren zum mittleren Drittel des Musculus vastus lateralis des rechten Oberschenkels erfolgte zunächst unter sterilen Bedingungen die Lokalanästhesie von Haut, Muskelfaszie und Muskelgewebe mit ca. 6 ml Lidocainhydrochlorid 1%. Die Biopsiestelle wurde mit einem sterilen Lochtuch abgedeckt, die benötigten Instrumente lagen auf einer sterilen Arbeitsfläche bereit. Nach einem kleinen Hautschnitt von 3 mm wurden je nach Erfolg bis zu sechs Stanzen entnommen, was einer Gesamtmenge von etwa 300 mg Muskelgewebe entspricht (Abbildung 10). Sofort nach der Entnahme wurden die Proben in Trockeneis gefroren. Die Haut wurde anschließend mittels Steristrips fixiert und mit einem Pflaster abgedeckt. Die Patienten verblieben nach Anlage eines komprimierenden Druckverbandes noch mindestens eine Stunde zur Überwachung im Studienzentrum. Alle Fett- und Muskelgewebeproben wurden unmittelbar nach der Entnahme bzw. Aufarbeitung eingefroren und bei -80°C gelagert.

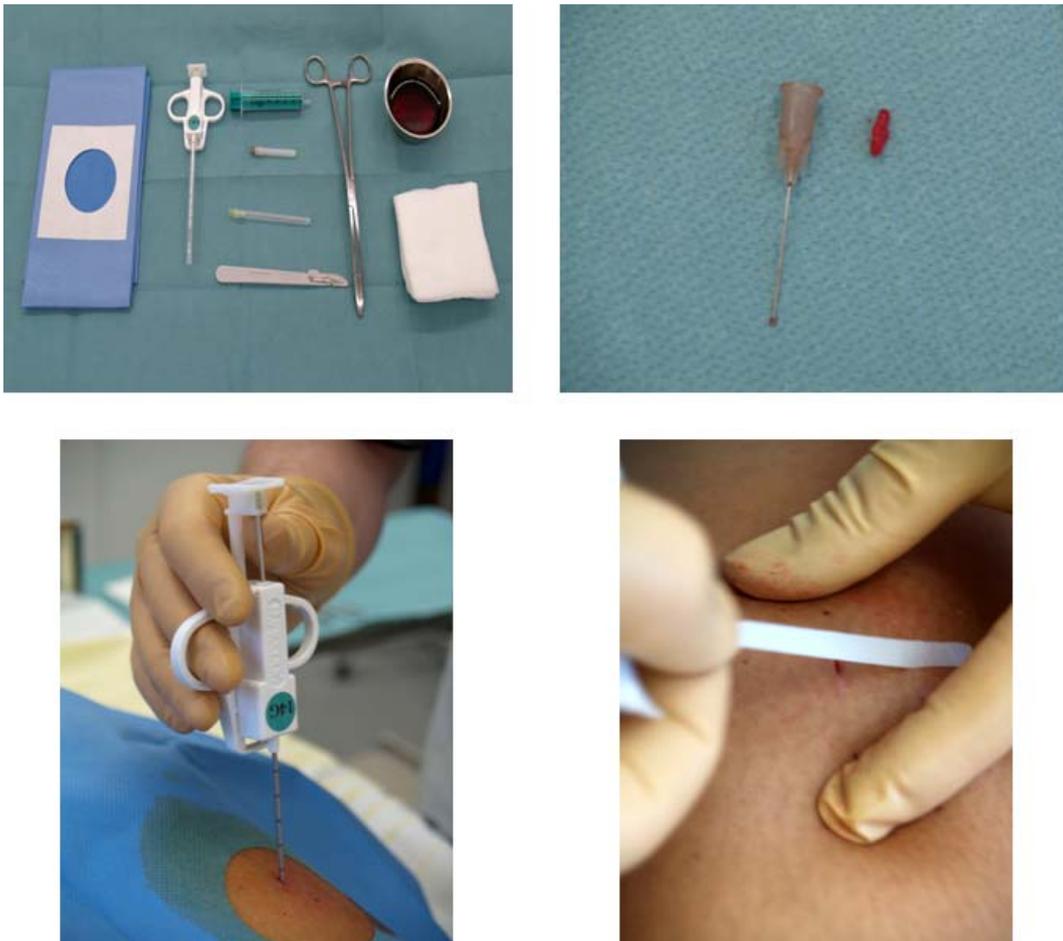


Abbildung 10: Muskelbiopsie

2.9 Genexpressionsanalyse im Fettgewebe und im Skelettmuskel

Mittels quantitativer TaqMan-RT-PCR wurde in den biopsierten Fettgewebe- und Muskelgewebeproben die Expression von sechs Genen des ECS bestimmt:

- Rezeptor-Gene: CB₁-R und CB₂-R
- Gene der EC-synthetisierenden Enzyme:
 - N-Arachidonylphosphatidyl-Ethanolamin-Phospholipase D (NAPE-PLD):
Synthese von Anandamid
 - Diacyl-Glycerol-Lipase (DAGL- α): Synthese von 2-AG
- Gene der EC-degradierenden Enzyme:
 - Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH): Abbau von Anandamid
 - Monoglycerid Lipase (MGL): Abbau von 2-AG

Zunächst wurde aus den Geweben die RNA isoliert. Vor der quantitativen Analyse der Genexpression musste RNA in cDNA umgeschrieben werden („reverse Transkription“). Die Genexpressionsanalyse mittels quantitativer real-time RT-PCR ergibt durch Vergleich mit einem internen Kontroll-Gen („Housekeeper“) einen normalisierten Wert. Durch dieses Verfahren wird der Vergleich von verschiedenen Probanden und verschiedenen Interventionen möglich. Die Analyse der Genexpression wurde von Dr. Jürgen Janke und Henning Damm im Adipozytenlabor in Berlin-Buch durchgeführt. Die Daten wurden für die vorliegende Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Daher werden im Folgenden die einzelnen Arbeitsschritte ohne weitergehende Details und Erklärungen dargestellt.

RNA-Extraktion aus Fettgewebe

Die RNA-Extraktion aus Fettgewebe erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, #74106), der Lyse- und Extraktionspuffer sowie Zentrifugationssäulen enthält. Zunächst wurden im Eisbad 5 bis 7 Keramikugeln zur Fettgewebeprobe gegeben und dann bei Raumtemperatur (RT) 600 μ l RLT-Lysispuffer dazu pipettiert. Für 2 \times 20 s bei 6800 rpm im Precellysis 24 (PeqLab) wurde das Gewebe vollständig homogenisiert. Das Homogenisat wurde in Gefäß 1 überführt (2 ml) und 5 min bei maximaler Geschwindigkeit der Tischzentrifuge (5417C, Eppendorf) ohne Zusätze zentrifugiert. Dies führte zur Trennung von wässriger Phase und Lipiden. Anschließend erfolgte die RNA-Extraktion bei Raumtemperatur (soweit nicht anders angegeben):

1. 700 μ l der wässrigen Phase in Gefäß 2 überführen (1,5 ml) und mit 700 μ l 70% Ethanol versetzen, zwei- bis dreimal invertieren und 30 s vortexen
2. Gesamtes Volumen in zwei Schritten auf eine Zentrifugationssäule (Gefäß 3) geben, das in einem Collect Tube (1,5 ml) steckt, und jeweils 20 s bei 8.000 g zentrifugieren, Durchflussfraktion verwerfen

3. 350 µl RW1-Puffer in Gefäß 3 pipettieren und 20 s bei 8.000 g zentrifugieren, Durchflussfraktion verwerfen
4. 80 µl DNase-Lösung auf die Membran tropfen und 15 min bei Raumtemperatur stehen lassen (RNase free DNase-Set, Qiagen, #79254)
5. 350 µl RW1-Puffer in Gefäß 3 pipettieren und 20 s bei 8.000 g zentrifugieren, Durchflussfraktion verwerfen, Gefäß 3 in neues Collect Tube stecken
6. 500 µl RPE-Puffer in Gefäß 3 pipettieren und 20 s bei 8.000 g zentrifugieren, Durchflussfraktion verwerfen, diesen Waschschrift wiederholen
7. Gefäß 3 in neues Collect Tube stecken
8. Membran (Gefäß 3) für 2 min bei 12.000 g trocken zentrifugieren
9. Gefäß 3 in ein sterilisiertes 1,5 ml-Eppendorfgefäß stecken (Gefäß 4)
10. 40 µl Eluat-Wasser (RNase-frei) auf die Membranen tropfen, 1 min inkubieren und dann 1 min bei 8.000 g zentrifugieren, Gefäß 4 auf Eis stellen
11. 4 µl Aliquot in 0,2 ml-Gefäß überführen und auf Eis stellen, die restliche RNA-Lösung bei -80°C einfrieren

RNA-Extraktion aus Skelettmuskelgewebe

Für die Isolierung sowohl der mRNA als auch der microRNA aus den Skelettmuskelproben wurde der MirVana Kit (Ambion, #AM1560) verwendet, der wiederum verschiedene Puffer und Zentrifugationssäulen enthält (verwendete Geräte wie für Fettgewebe). Zunächst wurden auf Trockeneis fünf bis sechs Keramikugeln zur Skelettmuskelprobe gegeben und dann bei Raumtemperatur (RT) 400 µl Lysispuffer aus dem MirVana Kit dazu pipettiert. Für 2 × 20 s bei 6.800 rpm wurde das Gewebe vollständig homogenisiert. Anschließend erfolgte die RNA-Extraktion bei Raumtemperatur (außer anders angegeben) durch folgende Schritte (alle Gefäße: 1,5 ml Eppendorf-Gefäße):

1. Homogenat vollständig in Gefäß 1 überführen
2. 5 min bei maximaler Geschwindigkeit der Tischzentrifuge zentrifugieren
3. Wässrige Phase komplett in Gefäß 2 überführen
4. 40 µl Additive aus dem MirVana Kit zugeben, 5 s vortexen, 10 min auf Eis stellen
5. 400 µl Phenol-Chloroform zugeben, 1 min vortexen
6. 5 min bei 10.000 g zentrifugieren

7. Obere wässrige Phase komplett in Gefäß 3 überführen
8. 750 µl 99% Ethanol zugeben, 5 s vortexen
9. Gesamte Flüssigkeit in zwei Schritten auf die Zentrifugationssäule (in Gefäß 4) geben
10. 20 s bei 10.000 g zentrifugieren, Durchflussfraktion verwerfen
11. 700 µl Wash Solution 1 zugeben, 20 s bei 10.000 g zentrifugieren, Durchflussfraktion verwerfen
12. 500 µl Wash Solution 2/3 zugeben, 20 s bei 10.000 g zentrifugieren, Durchflussfraktion verwerfen und Waschgang wiederholen
13. Membran der Zentrifugationssäule für 2 min bei 10.000 g trocken zentrifugieren
14. Säulen in Gefäß 5 stecken
15. 50 µl 95°C Eluat-Wasser auf die Membranen tropfen und 1 min bei 10.000 g zentrifugieren
16. Gefäß auf Eis stellen
17. 5 µl 10 × DNase Puffer zu den Proben geben
18. 1 µl DNase zu den Proben geben (Turbo DNA free, Ambion #AM1907)
19. 30 min bei 37°C im Thermomixer (comfort, Eppendorf) inkubieren
20. 5 µl DNase Inactivation Reagent zugeben, 5 s vortexen, bei RT 2 min inkubieren und in der Zeit alle 30 s für 5 s vortexen
21. 2 min bei 10.000 g zentrifugieren und 55 µl Überstand auf Eis in Gefäß 6 geben
22. 5 µl Aliquot in ein 0,5 ml Gefäß geben und restliche RNA bei -80°C einfrieren

Qualitätskontrolle und cDNA-Synthese

Die Qualitätskontrolle der RNA-Extraktion umfasste die Messung der RNA-Konzentration, des Verhältnisses der Absorption bei 260 nm und 280 nm und der Proteinkontamination bei 320 nm (Nanodrop ND-200c, Peqlab Biotechnologie, Erlangen). Außerdem wurde jede RNA-Probe im Bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbronn) mittels Kapillargelelektrophorese überprüft und auf Degradation der RNA (insbesondere Verhältnis von 18S:28S rRNA) geachtet. Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem High Capacity cDNA RT Kit von Ambion (#4368813):

1. 2 µg RNA in der Vakuumzentrifuge (Concentrator 5301, Eppendorf) eintrocknen (0,5 ml Gefäß) und in 14,2 µl RNase-freiem Wasser resuspendieren
2. Kit-Komponenten auf Eis auftauen lassen und einen Mastermix für die geplante Probenzahl auf Eis ansetzen.

Pro Probe wurden eingesetzt:

10 × RT Puffer	2,0 µl
5 × dNTP Mix (100 mM)	0,8 µl
10 × RT Random Primer	2,0 µl
MultiScribe RT	1,0 µl

3. 5,8 µl Mastermix zu jeder Probe geben, fünf- bis zehnmal resuspendieren
4. Proben in den Thermocycler stellen (DNA Thermocycler, Perkin Elmer): 10 min bei 25°C, 120 min bei 37°C, 5 s bei 85°C, dann 4°C
5. cDNA-Lösung bei -80°C lagern

Quantitative Real-Time RT-PCR

Die quantitative real-time RT-PCR wurde im 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Darmstadt) durchgeführt. Auch Primerpaare, fluoreszenzmarkierte Sonden und PCR-Reagentien wurden von Applied Biosystems bezogen (CB₁: #Hs00275634_m1; CB₂: #Hs00275635_m1; NAPE-PLD: #Hs00419593_m1; DAGL-α: #Hs00391374_m1; MGL: #Hs00200752_m1; FAAH: #Hs01038660_m1; 18S: #4319413E).

Der Ansatz für eine PCR enthält:

Universal TaqMan Master Mix Fast	5,0 µl (#4367846)
Pre developed TaqMan Assay	0,5 µl (Katalog-Nr: s.o.)
Uracil N-Glycosilase	0,1 µl (#8080096)
cDNA	1 ng (18S) 5 ng (alle ECS-mRNAs)

Der Ansatz wurde jeweils auf 10 µl H₂O aufgefüllt.

Die Messung aller Gene (Ziel- und Kontrollgene) erfolgte in Dreifachbestimmung. Ziel- und Kontrollgen einer cDNA-Probe wurden stets auf die gleiche 96-well Platte aufgetragen. Um Verunreinigungen der Assays zu erkennen, wurden zusätzlich „non template controls“ mit Wasser statt cDNA für Zielgen und Kontrollgen auf jeder Platte gemessen. Die PCR wurde mit 50°C für 2 min begonnen und mit 95°C für 10 min fortgesetzt. Es folgten 40 Zyklen mit 95°C für 3 s und 60°C für 30 s zur Amplifikation der cDNA. Nach Abschluss der PCR wurde manuell die Basislinie im Amplifikationsplot (Fluoreszenzintensität über Zyklenzahl) für die Fluoreszenzaktivität definiert und der Schwellenwert für das Überschreiten einer bestimmten

Fluoreszenzaktivität in die exponentielle Phase der Fluoreszenzintensitätszunahme gelegt. Die Zyklenzahl, bei der der Schwellenwert überschritten wurde, wird c_t -Wert genannt. Die c_t -Werte gehen in die Berechnung der Genexpressionsstärke ein.

Die sog. $\Delta\Delta c_t$ -Auswertemethode erfolgt in drei Schritten:

1. Δc_t -Wert = c_t -Wert des Zielgens – c_t -Wert des Kontrollgens
2. $\Delta\Delta c_t$ -Wert = Δc_t -Wert low fat – Δc_t -Wert high fat
3. Relative Abweichung = $2^{-\Delta\Delta c_t}$

Für die statistische Analyse der Daten in der 2-way-ANOVA wurden allerdings nur die Δc_t -Wert verwendet. Diese stellen die für die Expression des Kontrollgens korrigierten Expressionswerte der Zielgene dar. Dadurch werden ungleiche Ausgangsmengen von RNA/cDNA ausgeglichen.

2.10 Bestimmung von Anandamid im Plasma

Die Messung von Anandamid im Plasma erfolgte im Labor für Biomarker und Arzneimittelanalytik des Instituts für Klinische Pharmakologie der Medizinischen Hochschule Hannover unter Anleitung von Alexander Zörner und Dimitrios Tsikas. Details der Messmethode sind in der entsprechenden Publikation beschrieben (52). Alle Derivatisierungschemikalien wurden bei Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, Deutschland) bezogen; unmarkiertes d_0 -Anandamid und deuteriertes d_4 -Anandamid stammen von Cayman Chemical (Ann Arbor, Michigan, USA). Die Messung von Anandamid beinhaltet vier Schritte:

1. Extraktion der Plasmaprobe
2. Derivatisierung extrahierter Lipide
3. Trennung derivatisierter Lipide mittels Gaschromatographie
4. Bestimmung des endogenen Anandamids mittels Massenspektrometrie

Extraktion und Derivatisierung

1. 250 μ L Plasma auf Eis auftauen
2. d_4 -Anandamid in ethanolischer Lösung zugeben (Endkonzentration: 1 nM)
3. Nach 15 min: Extraktion mit 750 μ L Toluol für 2 min auf einem Vortex-Schüttler
4. Zentrifugieren bei $4.600 \times g$ für 5 min bei 4°C
5. Den klaren, farblosen Überstand in ein Probengläschen überführen und mittels Stickstoff-Evaporator Toluol verdampfen

6. 50 μL Ethylacetat sowie 50 μL Pentafluorbenzoylchlorid (PFBzCl, 10% v/v in Dichlormethan) dazugeben und das Gemisch 30 min bei 65°C erhitzen
7. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur das Gemisch mittels Stickstoff-Evaporator bis zur Trockne einengen
8. 100 Pentafluorpropionsäureanhydrid (PFPA, 10% v/v in Ethylacetat) und 10 μL Triethylamin (TEA, 1% v/v in Ethylacetat) zum Rückstand geben und das Probengläschen erneut für 30 min bei 65°C erhitzen
9. Die auf Raumtemperatur abgekühlte Probe bis zur Trockne einengen (Stickstoff-Evaporator) und den Rückstand in 800 μL Isohexan aufnehmen
10. Die Isohexanphase 3 \times für 10 s mit 500 μL Wasser ausschütteln und dann als obere Phase in ein weiteres Probengläschen überführen, bis zur Trockne einengen (Stickstoff-Evaporator) und den Rückstand in 50 μL Heptan aufnehmen

Gaschromatographie und Tandem-Massenspektrometrie (GC-MS/MS)

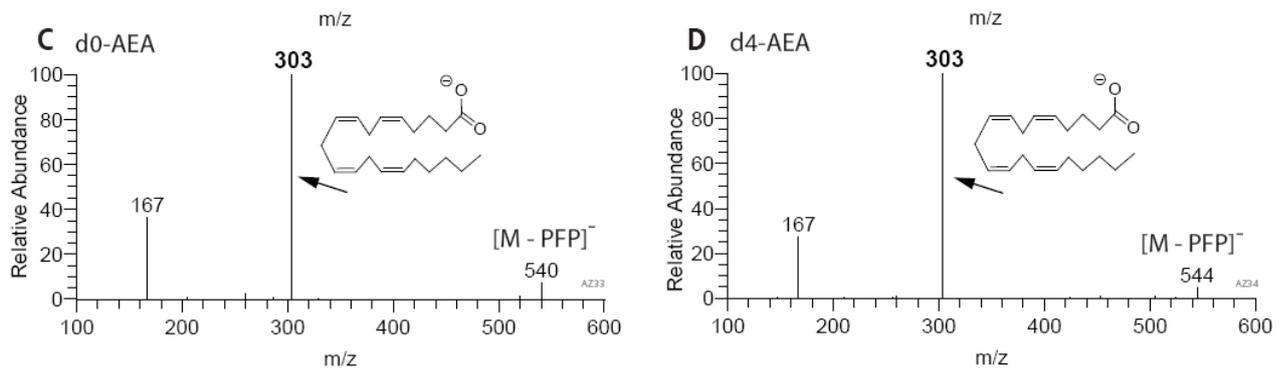


Abbildung 11: Darstellung der Fragmentierung von d₀-AEA und deuteriertem d₄-AEA nach gaschromatischer Trennung und Tandem-Massenspektrometrie (51)

m/z beschreibt die molekulare Masse des Fragments, die *y*-Achse zeigt die relative Häufigkeit der Fragmente in %.

Zur Messung wurde ein Gaschromatograph Trace 2000 (ThermoFisher, San Jose, CA, USA), gekoppelt an einen Autosampler AS 2000 (CE Instruments, Austin, TX, USA) und ein Tandem-Massenspektrometer TSQ 7000 (Finnigan MAT, San Jose, CA, USA) verwendet. Die gaschromatographische Trennung der derivatisierten Lipide fand auf einer DB-5ht fused silica Säule (15 m Länge \times 0.25 mm Innendurchmesser) von Agilent (Santa Clara, CA, USA) statt. Nach Injektion Aufheizen der Probe für 1 min auf 80°C, dann kontinuierliche Erwärmung mit 10°C/min auf 260°C, weitere Erwärmung mit 25°C/min bis 360°C, zuletzt 1 min konstant bei 360°C. Für die negative chemische Ionisierung in der Ionenquelle des Massenspektrometers

wurde Methan (530 Pa) verwendet. Für die Fragmentierung in der Kollisionskammer wurde Argon (0.2 Pa) verwendet. Für die Messung wurde 1 µL der aufgearbeiteten Probe mittels eines BEST PTV Injektors in das System injiziert. Während der Messung wurde das d_0 -AEA-Signal der Fragmentierung m/z 540 zu m/z 303 und das d_4 -AEA-Signal der Fragmentierung von m/z 544 zu m/z 303 aufgezeichnet (Abbildung 11).

2.11 Datenverarbeitung und statistische Analyse

Die erhobenen Daten und die Unterlagen zur Ernährungsberatung wurden in der Probandenakte gesammelt. Alle Proben wurden unter der pseudonymisierten Probandennummer verblindet analysiert. Die Berechnung von Messwerten erfolgte mit EXCEL 2002, die statistische Auswertung mit SPSS 16.0, die Fallzahlberechnung mit G*Power 2.0 und die graphische Darstellung mit GraphPad Prism 5.

Da die Probanden die fettarme und fettreiche Ernährung selbständig realisieren mussten, war damit zu rechnen, dass einige Studienteilnehmer die Diätvorgaben nicht erreichen würden. Daher war vor Studienbeginn im Prüfplan festgelegt, dass nur die Probanden in die statistische Auswertung einbezogen werden, die einen Mindunterschied von 11% Fettgehalt zwischen der fettarmen und der fettreichen Phase erreichen.

Der erste Schritt der statistischen Analyse war die Überprüfung aller Daten mittels Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung. Hierbei ergab sich, dass bis auf das hs-CRP alle Werte normal verteilt waren. Die hs-CRP-Werte wurden vor der statistischen Analyse durch logarithmische Transformation in eine Normalverteilung überführt.

Der Einfluss von Body Mass Index und Nahrungsfettgehalt auf die untersuchten Parameter wurde mittels 2-Way-ANOVA analysiert. Dabei bildete die Unterscheidung von schlanken und adipösen Probanden den Zwischengruppenfaktor und die Diätphase den Innergruppenfaktor. Die 2-Way-ANOVA erlaubte jeweils drei Aussagen:

1. Es besteht ein Gruppenunterschied schlank vs. adipös (* $p < 0,05$)
2. Es besteht ein Einfluss der Diätform (# $p < 0,05$)
3. Es besteht eine Interaktion zwischen BMI und Diät, d.h. die Fettaufnahme beeinflusst einen Parameter nur in einer Gruppe (§ $p < 0,05$)

Korrelationen wurden mittels Pearsons Korrelationskoeffizienten und linearer Regression untersucht. Für alle statistischen Tests galt ein $p < 0,05$ als statistisch signifikantes Ergebnis.

Für die Fallzahlberechnung der ECSF-Studie wurde der aus früheren Studien der Arbeitsgruppe bekannte Unterschied der Anandamid-Werte zwischen schlanken und übergewichtigen Menschen für Anandamid verwendet (4). Auf der Basis von $2,0 \pm 0,3$ pg/ml versus

2,8 ± 0,5 pg/ml ergab sich für ein $\alpha = 0,05$ und eine statistische Power von 85% die Fallzahl von 9 pro Gruppe für Anandamid als primäre Zielvariable für die vorliegende Arbeit. Da in der ECSF-Studie eine andere Methode zur Messung von Anandamid verwendet wurde und die Studienpopulation im Vergleich zur Referenzstudie unterschiedlich war, wurden insgesamt mehr Probanden eingeschlossen und dies entsprechend im Prüfplan vor der Ethikkommission begründet. Die Ethikkommission akzeptierte dieses Vorgehen.

3 Ergebnisse

3.1 Studienverlauf

Von den insgesamt 45 während des Screenings untersuchten Interessenten wurden 41 Probanden eingeschlossen und randomisiert. Von diesen haben 29 Frauen und Männer die Studie erfolgreich mit dem geforderten Unterschied in der Fettaufnahme zwischen fettarmer und fettreicher Phase von $\geq 11\%$ abgeschlossen (Abbildung 12). Gründe für Studienabbruch oder -ausschluss der Probanden waren ungenügende Compliance während der fettmodifizierten Ernährungsphasen und Verdacht auf das Vorliegen von Essstörungen nach detaillierter Analyse der Ernährungstagebücher, unterschätzter Zeitaufwand für die Protokollierung und Auswahl der Nahrungsmittel, berufliche Veränderung, Erkrankungen im Studienverlauf oder das Auftreten von Ausschlusskriterien wie veränderten Laborparametern oder Blutdruckwerten nach dem Screening. In keinem Fall standen gesundheitliche Veränderungen, die zum Studienabbruch oder -ausschluss führten, im Zusammenhang mit den Interventionen im Rahmen des Studienprotokolls. Für die Analyse konnten somit Daten von 15 schlanken Frauen, 2 schlanken Männern, 9 adipösen Frauen und 3 adipösen Männern verwendet werden. Insgesamt 9 Probanden nahmen während der Studie erlaubte Medikamente als Bedarfsmedikation ein. Hierzu gehörten Paracetamol bei Kopfschmerzen, Johanniskraut, Antihistaminika bei Heuschnupfen und Ciprofloxacin bei Blasenentzündung. In allen Fällen wurde ein Abstand von mindestens 7 Tagen zwischen letzter Medikamenteneinnahme und Durchführung der Untersuchungstage V3 und V5 eingehalten. Fünf Frauen setzten die Einnahme von Antikontrazeptiva als dauerhafte Medikation während der Studie fort.

Alle apparativen Untersuchungen wie Blutdruckmessung, EKG-Ableitung, BodPod[®]- und Bioimpedanzmessung waren für die Probanden ungefährlich und wurden problemlos akzeptiert. Das bewegungslose Liegen unter der Atemhaube des Kalorimetrieerätes erwies sich nur in einem Fall als problematisch. Bei der Durchführung der Routine- und Studienblutentnahmen kam es bei keinem der Probanden zu Komplikationen.

Die Muskel- und Fettgewebebiopsie wurde vom Großteil der Probanden gut toleriert. Eine Probandin lehnte die Biopsien grundsätzlich ab. Eine Probandin lehnte nach der ersten Fett- und Muskelbiopsie die zweite Entnahme ab, eine weitere Probandin lehnte nur die zweite Muskelbiopsie ab. In einem Fall kam es zu Kreislaufinstabilität einer Probandin, wonach die Muskelbiopsie sofort abgebrochen wurde. Alle anderen Entnahmen verliefen ohne Komplikationen. Über anhaltende Schmerzen an der Biopsiestelle (≥ 4 Tage) wurde in drei Fällen berichtet. Alle Probanden wiesen nach Fettgewebebiopsie ein tastbares Hämatom variabler Größe im Bauchfettgewebe auf, welches aber in der Verlaufskontrolle in jedem Fall

rückläufig war. Nach keiner der Biopsien trat eine Infektion auf. Eine Wiedervorstellung der Probanden im Studienzentrum war in keinem Fall notwendig, sodass die Abschlussvisite, wie im Protokoll vorgesehen, telefonisch erfolgen konnte.

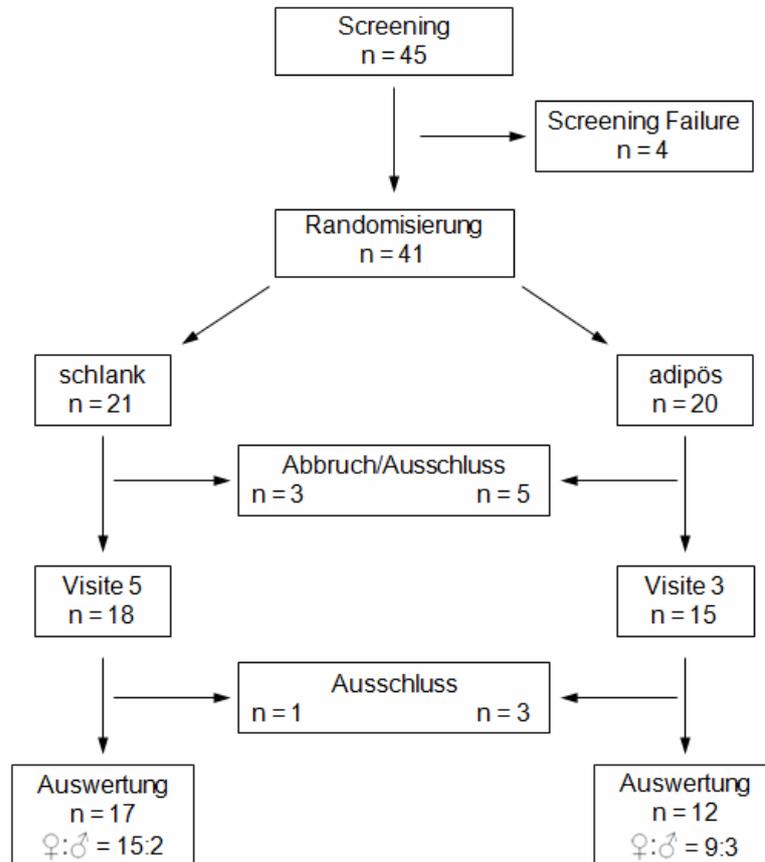


Abbildung 12: Entwicklung der Probandenzahlen im Studienverlauf

3.2 Diätcompliance

Die wichtigste Voraussetzung für die Verlässlichkeit der erhobenen Daten war die Diätcompliance der Studienteilnehmer. Diese wurde mit Hilfe der Ernährungsprotokolle ermittelt. Bei nicht korrekt geführten Ernährungstagebüchern oder Hinweisen auf ein gestörtes Essverhalten wurden die Probanden ausgeschlossen. Von den meisten Studienteilnehmern wurde das tägliche Protokollieren ihrer Mahlzeiten und die gezielte Auswahl und Kontrolle der verzehrten Lebensmittel als anspruchsvoll und zeitintensiv, dabei aber aufschlussreich beschrieben. Die Probanden waren lernbereit, sehr engagiert und am Studiengeschehen interessiert. Die Möglichkeit einer zusätzlichen Ernährungsberatung im Anschluss an die Studie wurde besonders von den übergewichtigen Probanden gern in Anspruch genommen. Die Auswertung der Ernährungstagebücher ergab einen mittleren Unterschied in der Fettaufnahme

von $23 \pm 1\%$ bei den schlanken und $22 \pm 1\%$ bei den adipösen Probanden. Analog war die Kohlenhydrataufnahme zwischen den Phasen unterschiedlich. Die Proteinaufnahme war mit durchschnittlich 16% konstant in allen Phasen und Gruppen (Abbildung 13).

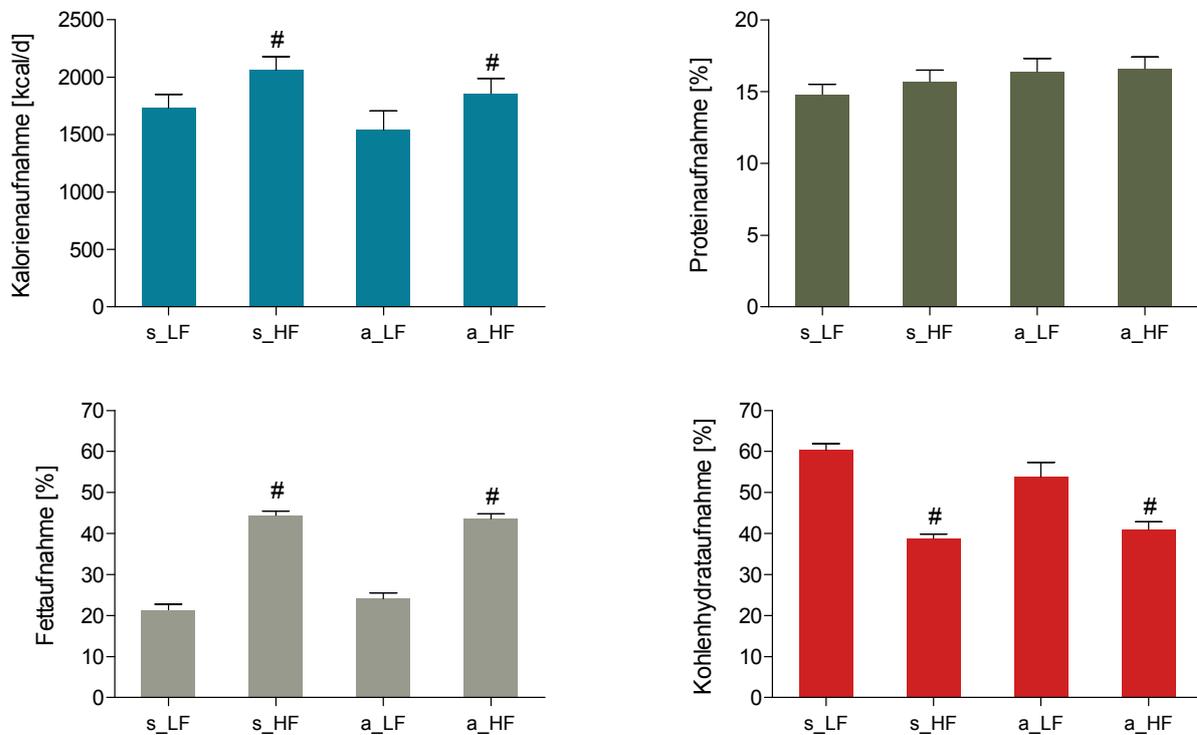


Abbildung 13: Ergebnisse der Ernährungstagebücher

LF: (low fat) Diät mit vorgesehenen 15% Fettanteil an täglicher Gesamtkalorienmenge, HF: (high fat) Diät mit vorgesehenen 45% Fettanteil an täglicher Gesamtkalorienmenge; s: schlank; a: adipös

Alle Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler. 2-way ANOVA: # $p < 0,05$ vs. LF.

3.3 Anthropometrische Daten

Die adipösen Probanden waren signifikant älter als die schlanken Probanden und wiesen anhand von BMI, Körperfettanteil und Taillenumfang deutliche Hinweise auf eine abdominale Adipositas auf (Abbildung 14). Da eine signifikante Korrelation zwischen den Messungen der Körperzusammensetzung mittels BIA und BodPod[®] bestand ($r = 0,74$ und $p < 0,0001$ für die Körperfettmasse), werden in der Arbeit nachfolgend nur die BodPod[®]-Daten dargestellt. Während aller isokalorischer Diätphasen blieben die anthropometrischen Parameter unverändert. Blutdruck und Herzfrequenz waren in der adipösen Gruppe jeweils höher, änderten sich im Studienverlauf aber nicht (Blutdruck: s_LF: $111 \pm 2 / 70 \pm 2$ mmHg; s_HF: $109 \pm 2 / 70 \pm 2$ mmHg; a_LF: $122 \pm 3^* / 77 \pm 2^*$ mmHg; a_HF: $124 \pm 4^* / 81 \pm 3^*$ mmHg; Herzfrequenz: s_LF 68 ± 3 /min; s_HF 67 ± 2 /min; a_LF 73 ± 2 /min*; a_HF 77 ± 4 /min*).

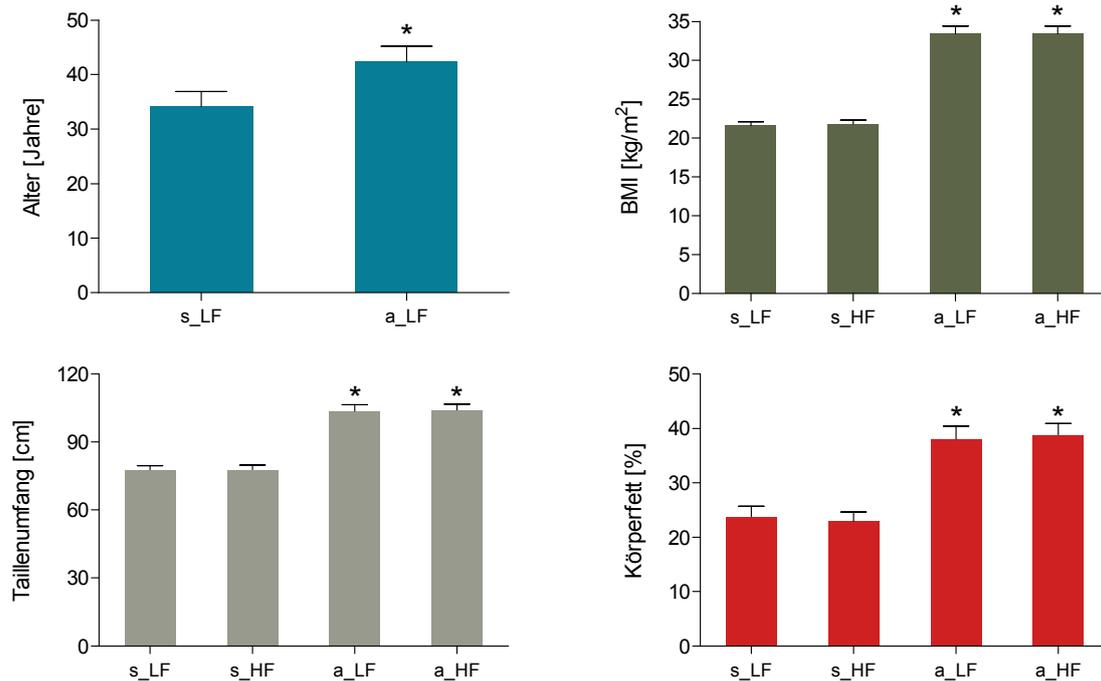


Abbildung 14: Alter und anthropometrische Daten

Alle Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler. 2-way ANOVA: * $p < 0,05$ vs. schlank.

3.4 Einfluss der Ernährung auf Körpergewicht, Lipide und hs-CRP

Bei der Betrachtung der Stoffwechselfparameter zeigten sich Unterschiede zwischen den schlanken und adipösen Probanden (Gesamtcholesterin, LDL- und HDL-Cholesterin, Triglyzeride). Trotz der Gruppenunterschiede in den Lipidparametern lagen keine klinisch relevanten Stoffwechselstörungen bei den adipösen Probanden vor (Abbildung 15). Im Verlauf der fettreichen Ernährung wurde in beiden Gruppen gleichermaßen ein Anstieg von Gesamt- und HDL-Cholesterin beobachtet.

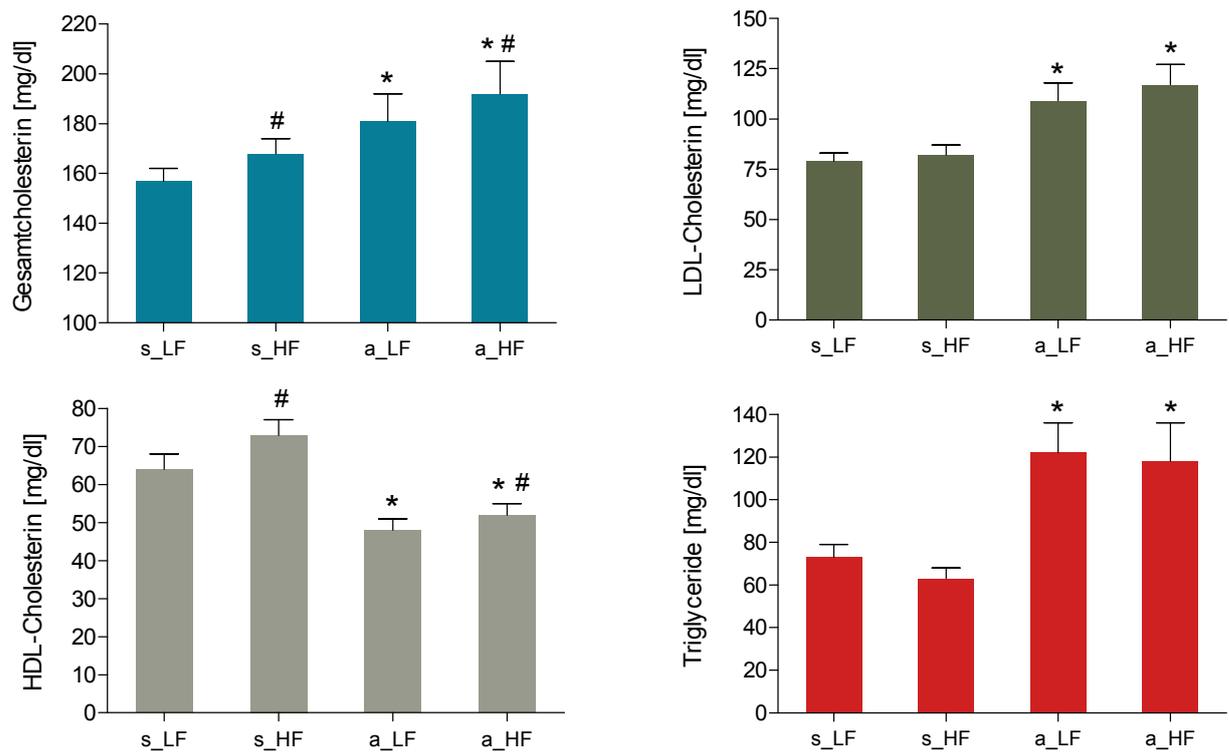


Abbildung 15: Lipidparameter

Alle Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler. 2-way ANOVA: * $p < 0,05$ vs. schlank; # $p < 0,05$ vs. LF.

Das hoch-sensitive CRP (hs-CRP) als Entzündungsmarker war bei Adipösen deutlich erhöht. Fettreiche Ernährung führte in beiden Gruppen zu einem signifikanten Anstieg des hs-CRP (Abbildung 16).

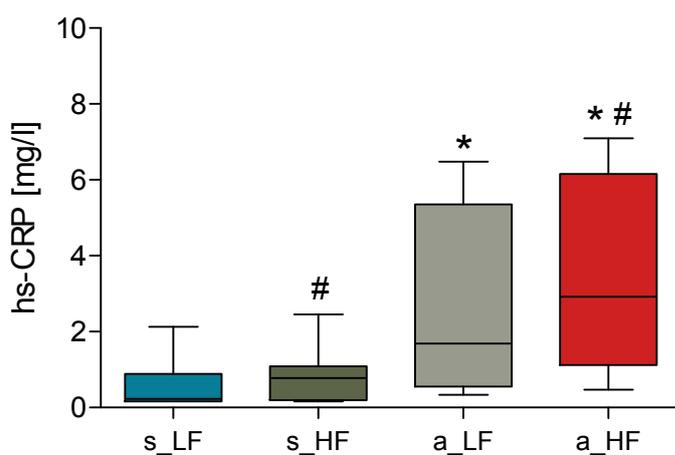


Abbildung 16: hs-CRP

Darstellung aufgrund fehlender Normalverteilung als Box-and-Whisker-Plot. 2-way ANOVA mit den logarithmierten, normalisierten Werten: * $p < 0,05$ vs. schlank; # $p < 0,05$ vs. LF.

3.5 Glukose, Insulin und Fettsäuren nach der Testmahlzeit

In beiden Gruppen lagen die Nüchtern-Glukosewerte am Ende jeder Diätphase konstant im Normbereich zwischen 89 - 92 mg/dl. Nüchtern-Insulin war jeweils in der Gruppe der Adipösen erhöht und blieb unbeeinflusst von der fettreichen Ernährung. Die Nüchternwerte der freien Fettsäuren lagen während der fettreichen Diät in beiden Gruppen signifikant höher als während der fettarmen Ernährungsphase.

Neben den Nüchternwerten wurden Glukose, Insulin und freie Fettsäuren auch im Verlauf nach Einnahme der Testmahlzeit bestimmt und die Flächen unter der Kurve (AUC) berechnet, die den Zeitraum bis 120 min nach Beginn der Testmahlzeit abbildeten (Abbildung 17). Nach Einnahme der fettarmen Testmahlzeit war entsprechend dem höheren Kohlenhydratanteil bei beiden Gruppen ein signifikant höherer Glukosewert nach 30 min zu beobachten, wobei das Ergebnis initial in der Gruppe der Schlanken noch höher lag als in der adipösen Gruppe. Bei der Betrachtung der AUC zeigt sich allerdings, dass die Glukosewerte in der Gruppe der adipösen Probanden in beiden Diätphasen signifikant höher lagen als in der Gruppe der Schlanken. Nach Einnahme der fettreichen Testmahlzeit stiegen die Glukosewerte in beiden Gruppen weniger stark an als unter fettarmer Nahrung und die Werte lagen in der Gruppe der adipösen Probanden zu allen Untersuchungszeiten signifikant höher.

Die Insulinantwort auf die fettarme und fettreiche Phase war in beiden Gruppen im Verlauf sehr ähnlich, doch lagen die Messergebnisse in der adipösen Gruppe in beiden Diätphasen auf signifikant höherem Niveau, entsprechend der höheren Glukosewerte und als Ausdruck der beginnenden Insulinresistenz. Bei der Auswertung der freien Fettsäuren zeigte sich nur ein Effekt des Nahrungsfettanteils, aber kein Gruppenunterschied. Nüchtern und im Zeitverlauf lagen die freien Fettsäuren nach fettreicher Testmahlzeit in beiden Gruppen signifikant höher als nach der fettarmen Testmahlzeit. Nach Einnahme der Testmahlzeiten war ein Abfall der Werte in beiden Gruppen bis 90 min zu beobachten. Danach war ein leichter Anstieg in beiden Gruppen zu erkennen, nur die Werte der adipösen Gruppe in der LF-Phase sanken weiter.

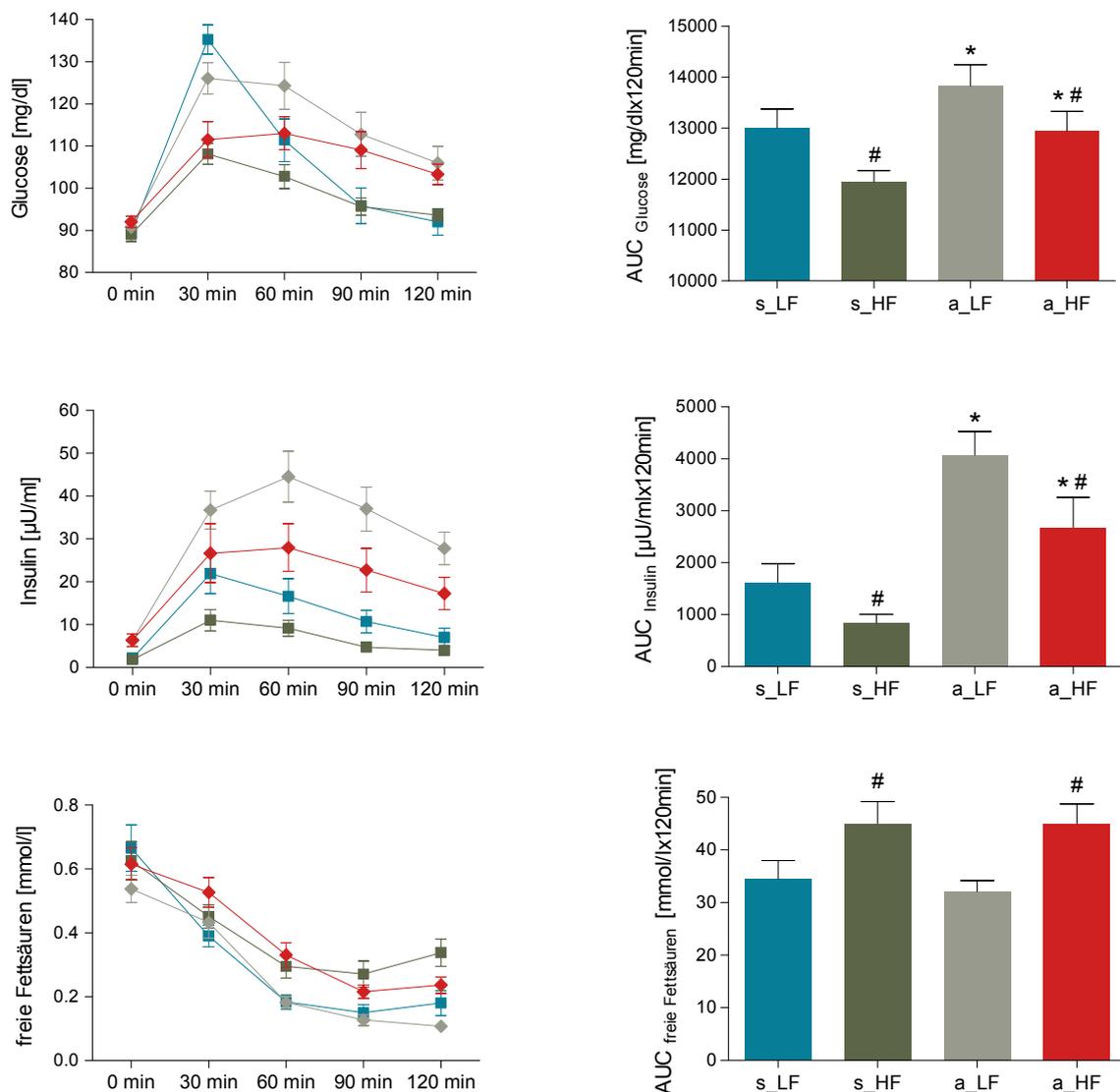


Abbildung 17: Glukose, Insulin und freie Fettsäuren nach der Testmahlzeit

Alle Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler. 2-way ANOVA: * $p < 0,05$ vs. schlank; # $p < 0,05$ vs. LF. blau: schlank LF, grün: schlank HF, grau: adipös LF, rot: adipös HF.

3.6 Anandamid

Die Nüchternwerte von Anandamid im Plasma waren bei den adipösen Probanden signifikant erhöht, unabhängig von der vorherigen zweiwöchigen fettarmen oder fettreichen Ernährung (Abbildung 18). Im Verlauf der Testmahlzeit zeigte sich nach 30 min eine deutlich sichtbare Reduktion von Anandamid, die über zwei Stunden anhielt und bei schlanken und adipösen Probanden nach der fettarmen Testmahlzeit gleichermaßen ausgeprägt war. Unter fettreicher Ernährung zeigte sich ein flacherer Kurvenverlauf mit einer Tendenz zum Anstieg nach 90 min.

Bei Auswertung der AUCs für Anandamid über 120 min war allerdings nur der Unterschied zwischen schlanken und adipösen Probanden signifikant. Die sichtbar geringere Suppression von Anandamid durch die fettreiche Testmahlzeit bei den Adipösen war mit $p = 0,050$ in der 2-Way ANOVA gerade nicht signifikant (Abbildung 18).

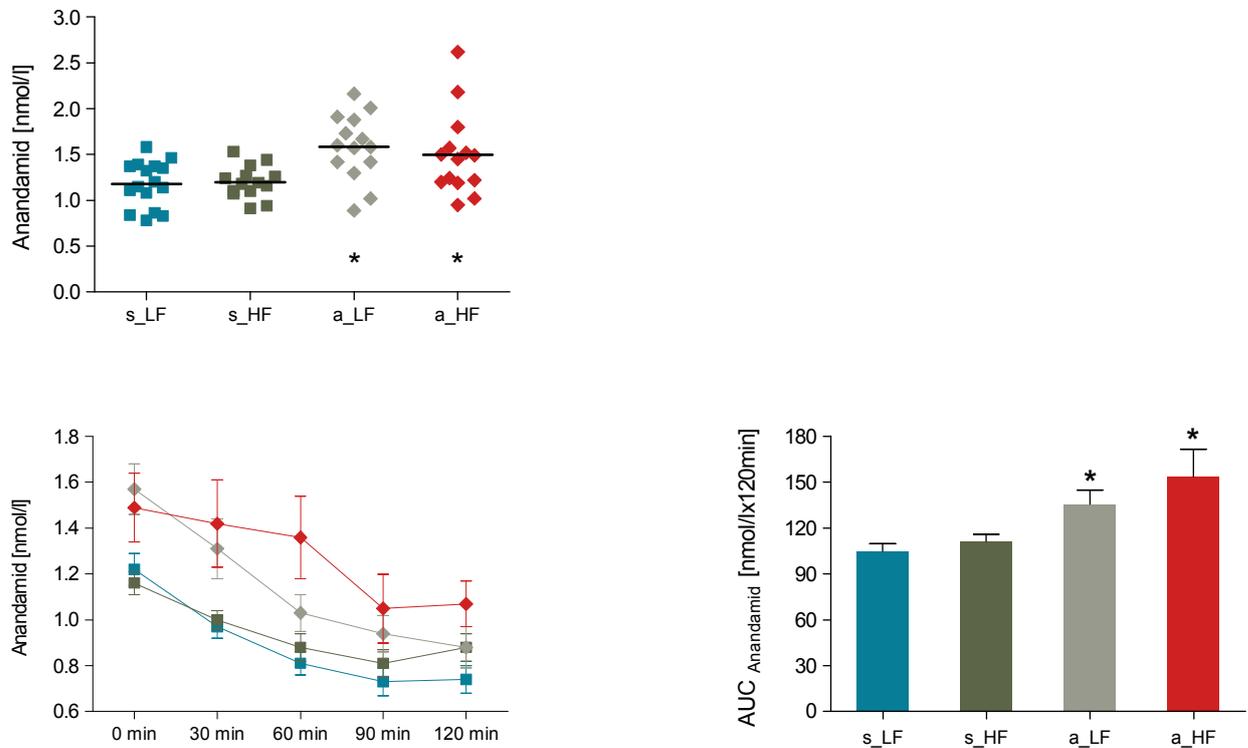


Abbildung 18: Anandamid nüchtern und nach der Testmahlzeit

Alle Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler. 2-way ANOVA: * $p < 0,05$ vs. schlank. blau: schlank LF, grün: schlank HF, grau: adipös LF, rot: adipös HF.

Die Analyse von Determinanten des Nüchtern-Anandamids und der Anandamid-Reduktion nach der Testmahlzeit wurde mittels linearer Regressionsmodelle und schrittweiser Elimination nicht signifikanter Variablen für jede Phase der Diät durchgeführt. Als unabhängige Variablen gingen hs-CRP, systolischer Blutdruck, Taillenumfang, Körperfettgehalt, Fettaufnahme während der Diätphasen und Nüchtern-Insulin in die Berechnungen ein. Bei Einschluss aller Variablen ergab sich folgendes Testergebnis in der fettarmen Phase: $r = 0,598$; $r^2 = 0,358$; $p = 0,222$. Nach Ausschluss aller anderen Variablen blieb das Nüchtern-Insulin als stärkste statistische Determinante übrig: $r = 0,498$; $r^2 = 0,248$; $p = 0,008$. In der fettreichen Phase ergab sich ein vergleichbares Ergebnis.

Die Analyse der AUC für Anandamid erfolgte nach dem gleichen Schema und schloss die Glukose-, Insulin- und freie Fettsäure-Antworten auf die Nahrungsaufnahme ein sowie den

Körperfettanteil und das hs-CRP. In der fettarmen Phase zeigte sich eine Abhängigkeit der Anandamid-AUC von der Kombination aus AUC Insulin und AUC Fettsäuren ohne wesentlichen Einfluss der anderen Variablen: $r = 0,638$; $r^2 = 0,407$; $p = 0,032$ (bezogen auf alle Variablen) vs. $r = 0,571$; $r^2 = 0,326$; $p = 0,007$ (AUC Insulin + AUC Fettsäuren). Wiederum glichen die Werte der fettreichen Phase dem Ergebnis der fettarmen Phase.

3.7 Genexpressionsanalyse in Fettgewebe und Skelettmuskel

Das Expressionsniveau der verschiedenen Gene im subkutanen Fettgewebe und im Skelettmuskel während der fettarmen Phase ist in Tabelle 3 dargestellt. Entsprechend der gewählten Analyseverfahren weist ein niedrigerer ΔC_t -Wert auf eine stärkere Expression hin. Die Messergebnisse zeigen, dass die meisten Gene des Endocannabinoid-Systems im Fettgewebe stärker exprimiert werden als im Skelettmuskel. Im Fettgewebe wird das Gen für den CB₂-Rezeptor am schwächsten, das Gen für die DAGL- α wird mittelstark, das Gen für die MGL am stärksten exprimiert. Im Skelettmuskel ist das CB₁-Rezeptor-Gen am geringsten und das MGL-Gen am stärksten exprimiert. Diese Beziehungen fanden sich jeweils sowohl bei den schlanken als auch bei den adipösen Probanden.

Tabelle 3: Expressionsniveau der ECS-Gene in Fettgewebe und Skelettmuskel unter fettarmer Diät

	ΔC_t im Skelettmuskel		ΔC_t im Fettgewebe	
	schlank, LF	adipös, LF	schlank, LF	adipös, LF
CB₁-R	19,4 ± 0,3 [◇]	18,9 ± 0,2 [◇]	15,4 ± 0,2	15,7 ± 0,3
CB₂-R	nicht messbar	nicht messbar	21,1 ± 0,3 [◇]	21,0 ± 0,2 [◇]
NAPE-PLD	15,8 ± 0,4	16,6 ± 0,4	16,1 ± 0,1	16,2 ± 0,1
DAGL-α	15,5 ± 0,1	15,6 ± 0,2	14,7 ± 0,1 [°]	14,3 ± 0,1 [◇]
FAAH	16,5 ± 0,2	16,5 ± 0,3	15,4 ± 0,1	15,9 ± 0,2
MGL	11,9 ± 0,3 [◇]	11,7 ± 0,2 [◇]	8,0 ± 0,1 [◇]	8,6 ± 0,1 [◇]

Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler. Die Daten in jeder Spalte wurden mittels ANOVA und Bonferronis multiplen t-Test analysiert. [◇]: $p < 0,05$ vs. alle anderen Gene in der Spalte. [°]: $p < 0,05$ vs. CB₁-R und NAPE-PLD.

Im Fettgewebe konnte kein Einfluss des Nahrungsfettgehaltes auf die Expression der ECS-Gene nachgewiesen werden (Abbildung 18). Das Gen für DAGL- α ist bei den Adipösen stärker, FAAH und MGL sind dagegen schwächer exprimiert.

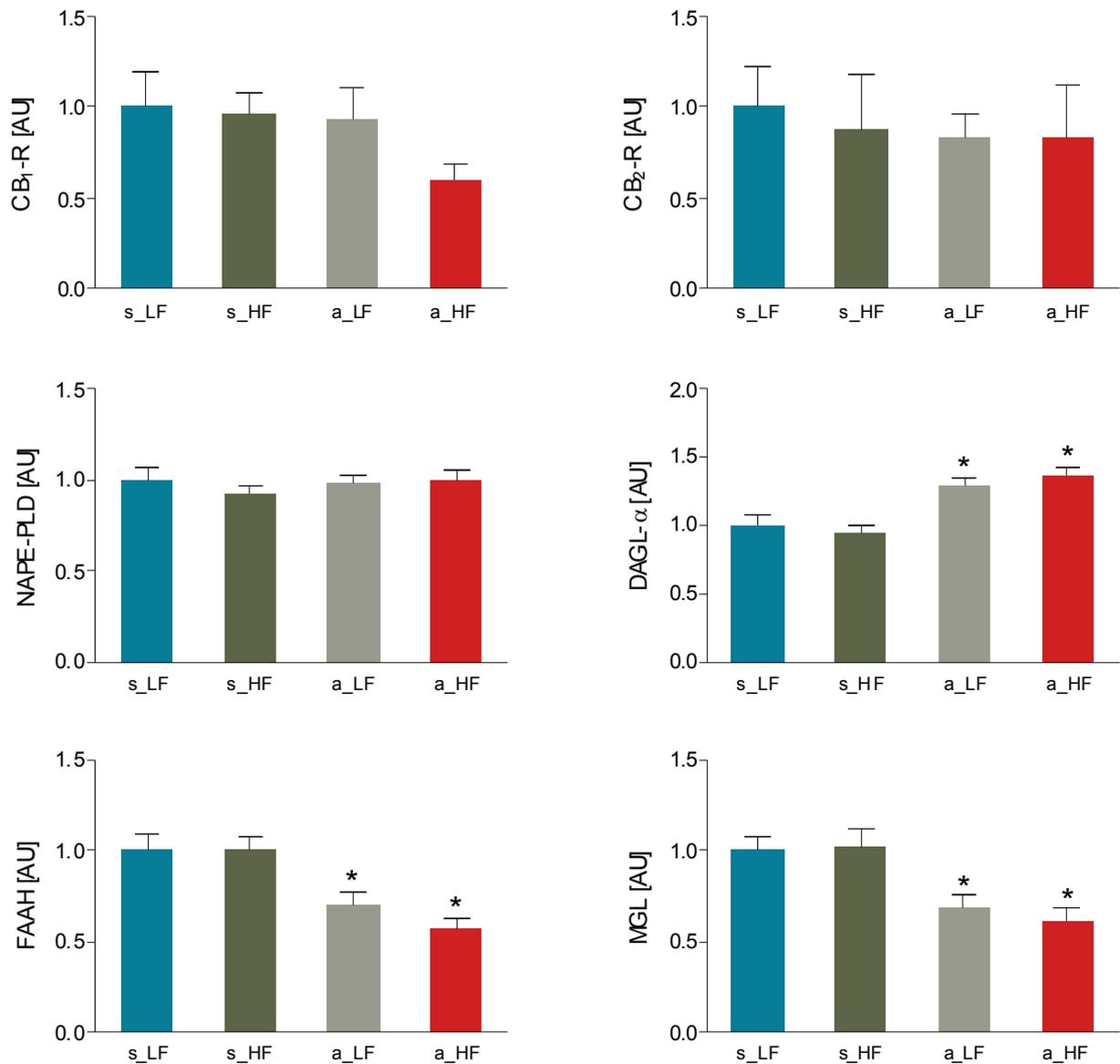


Abbildung 19: Expression der ECS-Gene im subkutanen Fettgewebe

Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt. 2-Way ANOVA: * $p < 0.05$ vs. schlank

Im Skelettmuskel wurde ein hemmender Einfluss der Hochfett-Diät auf die Expression der CB₁-R und MGL-Gene nachgewiesen. Dieser Einfluss der Ernährung trat sowohl bei den schlanken als auch bei den adipösen Probanden auf (Abbildung 20).

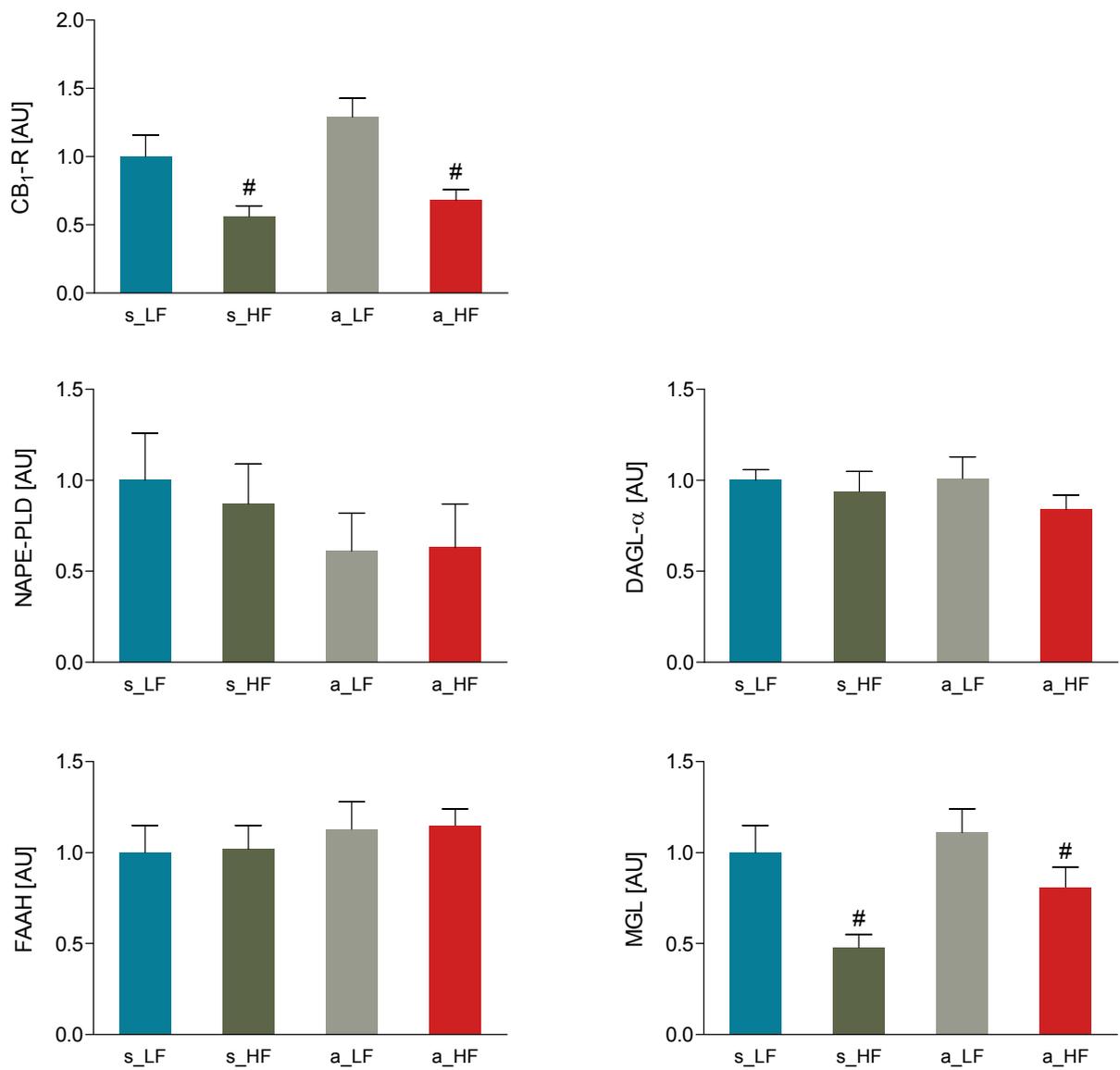


Abbildung 20: Expression der ECS-Gene im M. vastus lateralis

Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt. 2-Way ANOVA: # $p < 0.05$ vs. LF.

4 Diskussion

4.1 Reflektion der Hypothese

In früheren Studien wiesen adipöse Menschen unter standardisierten Nüchternbedingungen erhöhte Anandamid-Konzentrationen im Plasma auf (4, 31). Da fettreiche Ernährung eine Ursache für diese erhöhte Bioverfügbarkeit von Anandamid sein könnte, wurden im Rahmen der ECSF-Studie gesunde schlanke und adipöse Probanden für jeweils zwei Wochen fettarm oder fettreich ernährt und die Wirkung einer fettarmen bzw. fettreichen Testmahlzeit auf Anandamid ermittelt. Das wichtigste Ergebnis der ECSF-Studie ist die Reduktion des Plasma-Anandamids nach der Nahrungsaufnahme, die sich in beiden Probandengruppen zeigte. Dieser supprimierende Einfluss der Nahrungsaufnahme war unabhängig vom Fettgehalt der Testmahlzeit. Während sich der erwartete Unterschied des Nüchtern-Anandamids zwischen schlanken und adipösen Probanden bestätigte, zeigte sich kein Einfluss der zweiwöchigen fettreichen oder fettarmen Ernährung auf die Nüchtern-Anandamidwerte. Ebenfalls entgegen der zuvor formulierten Hypothese war kein eindeutiger Einfluss der Adipositas auf den postprandialen Verlauf des Anandamids nachweisbar. Der hier reproduzierte Befund der gesteigerten Bioverfügbarkeit von Anandamid bei Adipositas ist damit weder durch die Ernährungsgewohnheiten noch durch eine verminderte postprandiale Suppression bei Adipositas zu erklären. Damit wurde die zugrundeliegende Hypothese dieser Arbeit, dass Übergewicht und fettreiche Ernährung des Menschen zu einer gesteigerten Bioverfügbarkeit von Endocannabinoiden führen, in einem Punkt bestätigt und im zweiten Punkt widerlegt.

4.2 Einfluss der Ernährung auf Anandamid

Die vorliegenden Ergebnisse entsprechen den Beobachtungen früherer Studien, dass adipöse Menschen im Vergleich zu normalgewichtigen Personen erhöhte Nüchtern-Anandamidwerte im Blut aufweisen. Allerdings wirkte sich weder die zweiwöchige fettreiche noch die fettarme Diät auf die Plasma-Anandamidwerte in beiden Probandengruppen aus. Neben der chronischen Manipulation des Nahrungsfettgehaltes wurde auch die akute Wirkung einer fettarmen und fettreichen Testmahlzeit untersucht. Diese Verlaufsmessungen des Plasma-Anandamids nach der Nahrungsaufnahme am Ende jeder Diätphase zeigten folgendes Ergebnis: Nach fettarmer Testmahlzeit war nach 30 min in beiden Probandengruppen ein anhaltender Abfall der Anandamidwerte festzustellen, nach fettreicher Testmahlzeit ergab sich tendenziell eine abgeschwächte Suppression von Anandamid, die aber in der 2-way ANOVA mit $p = 0,050$ gerade nicht mehr signifikant war. Bei Analyse der $AUC_{0-120 \text{ min}}$ für Anandamid war ein signifikanter Unterschied zwischen schlanken und adipösen Personen sichtbar, der jedoch

ausschließlich auf den höheren Nüchternwerten basierte, denn schlanke und adipöse Probanden reagierten gleichermaßen mit einer parallel verlaufenden postprandialen Reduktion der Anandamid-Werte im Plasma. Somit scheint die Erhöhung des Nahrungsfettgehaltes weder akut (nach der Testmahlzeit) noch chronisch (nach 2 Wochen Ernährungsumstellung) für die Regulation des Plasma-Anandamids von Bedeutung zu sein.

Damit bestätigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit frühere Daten einer ähnlichen Studie von Matias et al., welche die akute Suppression von Anandamid im Blut durch Nahrungsaufnahme bei normalgewichtigen gesunden Probanden untersuchte (31). Hier wurde einmalig eine Testmahlzeit gegeben, die eine ähnliche Zusammensetzung wie die in der ECSF-Studie verordnete fettreiche Testmahlzeit hatte (601 kcal, 44% Fett, 39% Kohlenhydrate, 17% Protein). Die Autoren beschrieben postprandial einen deutlichen Anstieg des Insulins sowie eine Verringerung des Anandamids im Plasma. Jene Messergebnisse stellen allerdings eine Momentaufnahme der Stoffwechselsituation 1 h vor Testmahlzeit und 1 h postprandial dar und bildeten nicht, wie die Messungen der vorliegenden Arbeit, den detaillierten Verlauf ab. Die relative Reduktion von Anandamid 1 h postprandial ist mit 25 - 35% in beiden Studien vergleichbar.

Bei der Suche nach statistischen Prädiktoren des Plasma-Anandamids wurden mittels verschiedener Regressionsmodelle Korrelationen von Anandamid und ausgewählten Parametern untersucht. Sowohl in der fettarmen, als auch in der fettreichen Phase bestand eine positive Korrelation zwischen Nüchtern-Insulin und Nüchtern-Anandamid. Postprandial dagegen waren die AUCs von Anandamid, Insulin und freien Fettsäuren so eng miteinander korreliert, dass kein einzelner Prädiktor für die Suppression von Anandamid identifiziert werden konnte. Aufgrund der engen physiologischen Kopplung von postprandialem Insulinanstieg und Lipolysehemmung mit Abnahme der freien Fettsäuren ist dieser statistisch nachgewiesene Zusammenhang auch plausibel (53). Dies bedeutet, dass eine Person mit einer starken Insulinantwort (große AUC) eine weniger ausgeprägte Anandamid-Suppression aufweist (ebenfalls große AUC). Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass Insulin als negativer Regulator des Plasma-Anandamids wirkt. Matias et al. beschrieben erhöhte Endocannabinoid-Werte im viszeralen Fettgewebe und im Blut von Typ 2-Diabetikern (31). Der Zusammenhang von Insulin und Endocannabinoiden wird hier indirekt deutlich, denn bei Typ 2-Diabetikern wirkt Insulin aufgrund der ausgeprägten Insulinresistenz nicht mehr adäquat, sodass der fehlende hemmende Effekt von Insulin bei diesen Patienten zu erhöhten Endocannabinoid-Konzentrationen im Fettgewebe führen könnte.

Diese Hypothese wurde kürzlich weiterführend untersucht (54). Der Einfluss der akuten Glukoseaufnahme auf Anandamid wurde im Rahmen eines oralen Glukosetoleranztests bei 10

adipösen (BMI = 36 kg/m², Nüchtern-Insulin = 15 mU/l) und 10 schlanken Probanden (BMI = 22 kg/m², Nüchtern-Insulin = 7 mU/l) verglichen. Glukosezufuhr reduzierte die Anandamid-Plasmawerte bei den schlanken Probanden um etwa 30%, bei den adipösen Probanden hingegen nur um etwa 6%. Dieser deutliche Unterschied zwischen schlanken und adipösen Probanden entspricht allerdings nicht den vorliegenden Ergebnissen der ECSF-Studie. Weiterhin korrelierte in jener Studie die Reduktion von Anandamid negativ mit BMI, Bauchumfang, subkutanem Fettgewebe, Nüchtern-Insulin und den AUCs für Glukose und Insulin. Insulin wirkte als negativer Regulator des Plasma-Anandamids in beiden Probandengruppen. Dieser Effekt zeigte sich umso deutlicher, je weniger stark Prädiktoren von Insulinresistenz und Dyslipidämie ausgeprägt waren (54). 2-AG änderte sich in jener Studie nur geringfügig bei den Schlanken und gar nicht bei den Adipösen. Die gleiche Publikation berichtet über die Auswirkung eines euglykämisch-hyperinsulinämischen Clamps auf die Plasma-Endocannabinoidkonzentrationen an 19 überwiegend schlanken Männern (BMI = 26 kg/m²), wovon sieben Typ 2-Diabetiker waren. Die Insulininfusion reduzierte Anandamid deutlich, allerdings weitaus stärker bei den gesunden Probanden als bei den Typ 2-Diabetikern. Im Gegensatz dazu änderte sich 2-AG bei den Gesunden kaum und nahm bei den Diabetikern nach der Insulininfusion sogar zu. Die Aussagekraft dieser Arbeit wird allerdings durch einige Widersprüche in der Ergebnisdarstellung geschwächt (54). Eher unplausibel sind auch die hohen Anandamid-Konzentrationen bei den Adipösen (15 mal höher als die im Rahmen der ECSF-Studie ermittelten Werte) sowie das eher untypische Verhältnis von Anandamid zu 2-AG (1 : 1 im Gegensatz zu normalerweise etwa 1 : 3 bei Schlanken), sodass einige Zweifel an der Validität der Endocannabinoid-Messung angebracht sind.

Zu den Arbeiten von Matias et al. (31) und Osei-Hyiaman et al. (35), die die Grundlage für die Hypothese dieser Arbeit bildeten (s. 1.5), kamen im Verlauf der ECSF-Studie noch einige neuere Studien hinzu, die weitere Erkenntnisse über die Regulation des Endocannabinoid-Systems unter verschiedenen Diätbedingungen in vitro oder im Tiermodell lieferten. In diesen neuen Studien ging es darum, den Einfluss der in der Nahrung enthaltenen Fettsäuren auf die Regulation des Endocannabinoid-Systems zu untersuchen. Im Speziellen wurde die Frage gestellt, ob die Variation des Gehaltes und der Zusammensetzung an mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFAs - polyunsaturated fatty acids) in einer speziellen Diät die Bioverfügbarkeit von Endocannabinoiden moduliert. Von besonderem Interesse war die Arachidonsäure, die als mehrfach ungesättigte freie Fettsäure einen primären Baustein für die Synthese von Endocannabinoiden, Prostaglandinen, Thromboxanen und Leukotrienen darstellt.

Berger et al. versetzten Milch mit verschiedenen PUFAs und fütterten damit neugeborene Ferkel für 18 Tage. Die Milch mit großem Anteil an PUFAs erhöhte die Anandamid-Konzentrationen abhängig von der untersuchten Hirnregion. Milch ohne Fettsäure-

Supplementation dagegen verringerte den Anandamid-Gehalt im Hirnstamm sowie in Seh- und Hörrinde. Allerdings reagierten manche Regionen auch nicht oder gegensätzlich: Im Striatum, einem Teil der Basalganglien, führte Arachidonsäure-Supplementation zu niedrigerem Anandamid-Gehalt. Im Hippocampus gab es keine Veränderung (55). Eine andere Studie untersuchte die Wirkung verschiedener langkettiger PUFAs auf isolierte Mausadipozyten. Die Inkubation dauerte jeweils 72 h, allerdings war die Konzentration der jeweiligen Fettsäure (100 μ M) unphysiologisch hoch. Der Anandamid-Gehalt der Adipozyten wurde nur durch Docosahexaensäure beeinflusst und nahm deutlich ab, Arachidonsäure dagegen zeigte in den Mausadipozyten keinen Effekt (56). Die Autoren folgerten, dass die PUFA-Aufnahme mit der Nahrung die Phospholipid-Konzentration und damit die Verfügbarkeit der unmittelbaren Endocannabinoid-Vorstufen in den Adipozyten moduliert. Somit plädierten sie, wie schon andere Autoren (57, 58), für die veränderte Verfügbarkeit von Endocannabinoid-Vorstufen als Ursache veränderter Endocannabinoid-Konzentrationen. Ähnliche Ergebnisse beschrieben Artmann et al., die sechs Gruppen von Ratten mit sechs isokalorischen Diäten fütterten und den Einfluss der unterschiedlichen Nahrungsfette auf Anandamid und andere Endocannabinoide ermittelten. Neben einer Kontrolldiät wurden fünf verschiedene Diäten eingesetzt, die jeweils eine langkettige Fettsäure oder Gruppe von Fettsäuren im Überschuss enthielten: Palmitinsäure, Ölsäure, Linolsäure, Arachidonsäure und Fischöl (Eicosapentaensäure + Docosapentaensäure + Docosahexaensäure). Im Gehirn nahm Anandamid unter Ölsäure-reicher Diät zu. Im Jejunum nahm Anandamid unter Arachidonsäure-reicher Diät zu und unter Fischöl-reicher Diät ab. In der Leber nahm Anandamid unter Arachidonsäure-reicher Diät zu (59). Die vermehrte Zufuhr von Arachidonsäure scheint somit in einigen der untersuchten peripheren Gewebe die Endocannabinoid-Synthese zu steigern.

Können die vorliegenden Messergebnisse also durch eine diätbedingte Versorgung mit Arachidonsäure entstanden sein? Primär sollte in der ECSF-Studie eben nicht der Einfluss der Arachidonsäure auf die Endocannabinoid-Synthese untersucht werden, sondern mit der täglichen Supplementierung von Arachidonsäure eine stabile Versorgung gewährleistet werden. Die Probanden nahmen täglich 1 EL Erdnussöl zu sich, was einer Menge von ca. 190 mg Arachidonsäure entspricht. Aus den Ernährungstagebüchern ergibt sich folgendes Ergebnis für die tägliche Arachidonsäure-Aufnahme: schlank-LF: 340 ± 42 mg; schlank-HF: 448 ± 37 mg; adipös-LF: 392 ± 55 mg und adipös-HF: 376 ± 37 mg. Die Analyse mittels 2-way ANOVA zeigt keinen Unterschied zwischen schlanken und adipösen Probanden, keinen Einfluss der Diät und eine Tendenz zu mehr Arachidonsäure-Aufnahme unter fettreicher Diät bei den Schlanken, die mit $p = 0,063$ nicht statistisch signifikant war. Der Einfluss der Arachidonsäure-Zufuhr auf die gemessenen Anandamid-Konzentrationen im Blut kann damit weitgehend ausgeschlossen werden.

Die Auswirkung fettreicher Diäten im Tiermodell wurde auch von Matias et al. untersucht, die Mäuse mit zwei fettreichen Diäten fütterten und einen vergleichbaren Gewichtsanstieg beobachteten (6). Nur die Diät mit einem großen Anteil an gesättigten und einem geringeren Gehalt an einfach- und mehrfach ungesättigten Fettsäuren führte zum Anstieg von Anandamid im braunen Fettgewebe. Der insgesamt etwas kleinere Nahrungsfettgehalt hingegen spielte keine Rolle. Da die zweite fettreiche Diät bei gleicher Gewichtszunahme nicht wirkte, scheint im braunen Fettgewebe die Fettsäurezusammensetzung der Diät von Bedeutung für die Anandamid-Bildung zu sein. Im Gegensatz dazu reagierte Anandamid im Skelettmuskel der Mäuse nicht auf die fettreiche Diät. In Herz und Niere stieg Anandamid unter beiden fettreichen Diäten gleichermaßen an, hier spielte also die Gewichtszunahme eine größere Rolle als die Fettsäurezusammensetzung (6). Starowicz et al. fütterten Mäuse 14 Wochen mit einer fettreichen Diät. Die fettreiche Diät bewirkte eine verringerte immunhistochemische Anfärbung der DAGL- α und NAPE-PLD im subkutanen Fettgewebe, bei verstärkter Anfärbung der FAAH. Zu diesen Befunden passt allerdings nicht, dass im Zeitverlauf die Anandamid-Konzentrationen im subkutanen Fettgewebe unter fettreicher und Standard-Diät gleichermaßen abnahmen. Der gleiche diskrepante Befund zeigte sich auch im viszeralen Fettgewebe. Der CB₁-Rezeptor wurde durch die fettreiche Diät nicht beeinflusst. Im Pankreas dagegen stieg Anandamid zu Beginn der Gewichtszunahme deutlich an, im Verlauf von 14 Wochen glichen sich die Werte in beiden Tiergruppen aber wieder an (57).

Zusammenfassend zeigten einige Tierstudien, dass die Anandamid-Konzentration in verschiedenen Geweben durch die Gabe langkettiger Fettsäuren oder durch fettreiche Diät beeinflusst werden kann. Jedoch lässt sich die Frage, ob und inwiefern die Fett- oder Fettsäureaufnahme die Bioverfügbarkeit von Endocannabinoiden beeinflusst, nicht einfach beantworten. Spezies- und Gewebeunterschiede und offensichtlich auch die Fettsäurezusammensetzung einer Diät sind von großer Bedeutung (60).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erlauben eine detaillierte Beschreibung der Regulation des Plasma-Anandamids durch fettarme und fettreiche Ernährung beim Menschen: Die akute Suppression von Anandamid durch Nahrungsaufnahme ist bei Adipositas erhalten. Ausgehend von einem erhöhten Nüchternwert erfolgt sie allerdings auf einem insgesamt höheren Konzentrationsniveau. Da der Nahrungsfettgehalt aber nicht zu einer unterschiedlichen postprandialen Reaktion führt und insbesondere auch nicht die Nüchternwerte von Anandamid beeinflusst, kann die zuvor gestellte Hypothese in diesem Punkt nicht bestätigt werden. Gesteigerte Nahrungsfettaufnahme erklärt die erhöhte Bioverfügbarkeit von Anandamid bei adipösen Menschen nicht.

4.3 Nahrungseinfluss auf die Gene des Endocannabinoid-Systems

Die Expression folgender Gene des Endocannabinoid-Systems wurde im subkutanen Fett- und im Muskelgewebe bestimmt: CB₁- und CB₂-Rezeptor, NAPE-PLD und DAGL- α (Endocannabinoid-Synthese), MGL und FAAH (Endocannabinoid-Abbau). Dadurch sollte die Regulation dieser Gene in peripheren Geweben unter Einfluss der zweiwöchigen fettarmen bzw. fettreichen Diät untersucht werden. Zunächst zeigte sich, dass mit Ausnahme der NAPE-PLD alle Gene stärker im Fettgewebe als im Skelettmuskel exprimiert werden. Insbesondere die MGL weist ein starkes Expressionsniveau im Fettgewebe auf. Da dieses Enzym nicht spezifisch für die Endocannabinoid-Degradation ist, sondern alle Monoglyzeride abbaut, ist dieser Befund auch plausibel (15). Im Muskel waren CB₂-Rezeptoren nicht nachweisbar. Das sehr schwache Signal im Fettgewebe ist am ehesten durch eine Kontamination mit Makrophagen zu erklären (61), denn humane Adipozyten exprimieren keine CB₂-Rezeptoren (4, 29).

Bei der Betrachtung des Einflusses des Nahrungsfettgehaltes auf die Gene des Endocannabinoid-Systems ergaben sich zwei wesentliche Ergebnisse: Im subkutanen Fettgewebe beeinflusst der Fettgehalt der Nahrung die Genexpression des Endocannabinoid-Systems nicht. Bei Adipositas ist aber das Gen für die DAGL- α stärker und die Gene für die MGL und die FAAH sind schwächer als bei den schlanken Probanden exprimiert. Im Gegensatz dazu führte fettreiche Ernährung in beiden Probandengruppen zu einer Verminderung der Genexpressionen für den CB₁-Rezeptor und die MGL im Skelettmuskel, aber zu keinen unterschiedlichen Ergebnissen zwischen schlanken und adipösen Probanden. Damit liegt eine gewebespezifische Regulation der Gene des Endocannabinoid-Systems vor: Fettgewebe wird offensichtlich durch Adipositas beeinflusst, Skelettmuskel durch fettreiche Ernährung.

Im Fettgewebe von Tieren und Menschen wurden Endocannabinoid-Verbindungen vereinzelt gemessen, in der Regel waren die Gewebekonzentrationen von Anandamid und 2-AG bei Adipositas erhöht (6, 31). Demnach könnte die hier beschriebene vermehrte DAGL- α -Genexpression zu vermehrter Bildung von 2-AG bei Adipositas führen. Ebenso könnte die gesteigerte lokale Verfügbarkeit der Endocannabinoid-Verbindungen zur früher beschriebenen verringerten Expression des CB₁-Rezeptors führen (4, 5). Diese Veränderung der CB₁-Rezeptor-Expression bei Adipositas wurde in der vorliegenden Studie nur tendenziell bei fettreicher Diät beobachtet. Hier scheint im Vergleich zu den vorherigen Studien wahrscheinlich der Altersunterschied der Probanden eine Rolle zu spielen.

Die verminderte Genexpression von FAAH und MGL im Fettgewebe adipöser Probanden könnte zu einem verminderten Abbau der Endocannabinoid-Verbindungen bei Adipositas führen. In jedem Fall entsprechen die hier erhobenen Ergebnisse der schon früher berichteten reduzierten FAAH-Expression im Fettgewebe adipöser Menschen (4, 5). In diesen Studien wurden auch

erhöhte Anandamid- und 2-AG-Konzentrationen im Blut beschrieben. Es ist nicht bewiesen, dass zirkulierende Endocannabinoide und Endocannabinoid-Degradation im Fettgewebe in einem funktionellen Zusammenhang stehen, aber die Gesamtheit der Befunde weist auf eine Aktivierung des peripheren Endocannabinoid-Systems bei adipösen Menschen hin. Aus methodischen Gründen konnte in der vorliegenden Studie nur subkutanes Fettgewebe untersucht werden. Damit bleibt unklar, ob das metabolisch und pathophysiologisch wichtige viszerale Fettgewebe in gleicher Weise resistent gegenüber fettreicher Ernährung ist (62). Blüher et al. wiesen in einer Querschnittstudie eine gleichsinnige Korrelation der CB₁-Rezeptor- und FAAH-Genexpression im subkutanen und viszeralen Fettdepot nach (5).

Wenn der Fettgehalt der Nahrung entsprechend der hier erhobenen Befunde keinen Einfluss auf die Expression der Gene des Endocannabinoid-Systems im Fettgewebe hat, stellt sich die Frage nach anderen Einflussfaktoren, die die veränderte Expression bei Adipositas erklären können. Murdolo et al. untersuchten hierzu den akuten Effekt von Insulin auf die Genexpression des CB₁- und CB₂-Rezeptors sowie der FAAH im subkutanen Fettgewebe von 9 schlanken und 9 übergewichtigen gesunden Männern (63). Dazu führten sie Fettgewebebiopsien im Nüchternzustand und nach einem euglykämisch-hyperinsulinämischen Clamp durch. Weder die Expression des CB₁- noch des CB₂-Rezeptors änderte sich durch die Insulininfusion. Überraschenderweise war die FAAH-Genexpression in dieser Studie bei den adipösen Probanden signifikant größer als bei der schlanken Vergleichsgruppe. Hyperinsulinämie regulierte die FAAH-Expression bei den schlanken Männern um ein Zweifaches nach oben, während sich bei den Übergewichtigen keine signifikante Veränderung zeigte. Neben der Fallzahl ist an dieser Studie vor allem die unkritische Beschreibung des CB₂-Rezeptors zu bemängeln, denn in Rezeptorbindungsstudien ist bereits verlässlich nachgewiesen worden, dass humane Adipozyten keine CB₂-Rezeptoren exprimieren (29).

Der Einfluss von Insulin auf die FAAH wurde auch an isolierten insulin sensitiven und insulinresistenten Mausadipozyten und DIO-Mäusen untersucht (64). Die Insulin-Inkubation der Adipozyten über 24 Stunden reduzierte die intrazellulären Anandamid- und 2-AG-Konzentrationen um 50 - 66% im Vergleich zu unbehandelten Adipozyten. Als Mechanismus wurde eine signifikante Steigerung der FAAH- und MGL-Genexpression (im Sinne eines gesteigerten Abbaus) beschrieben. Außerdem sank die Expression der NAPE-PLD bis 4 Stunden nach Inkubation ab, stieg im Verlauf aber wieder an. Die DAGL- α stieg bis zu einem Maximum bei 8 Stunden an und fiel dann wieder leicht ab. Damit scheint Insulin den hemmenden Effekt auf Anandamid sowohl durch verringerte Synthese als auch durch gesteigerten Abbau auszuüben. Künstlich erzeugte Insulinresistenz in den Mausadipozyten führte dazu, dass die FAAH nicht mehr durch Insulin reguliert wurde. Die NAPE-PLD-Expression stieg an, reagierte aber noch mit einer Reduktion auf Insulin. Damit könnte

Insulinresistenz in Adipozyten zu einer vermehrten Synthese und einem reduzierten Abbau von Anandamid führen. Desweiteren führte die Diät-induzierte Adipositas bei diesen Mäusen zu einer verringerten FAAH-Expression im Fettgewebe (64). Dieser Befund wurde bereits in Studien mit adipösen Menschen beschrieben (4, 5). In der Summe können all diese Befunde die in der vorliegenden Arbeit beobachtete postprandiale Suppression von Anandamid, wie sie in Kapitel 3.5 beschrieben und in Kapitel 4.1 diskutiert wurde, erklären.

Über die Rolle des Endocannabinoid-Systems im Skelettmuskel liegen nur wenige Daten vor. Eine Arbeit untersuchte fettreiche Ernährung bei Mäusen mit Leptin-Gen-Defekt (*ob/ob*), einem sehr speziellen Modell der Adipositas. Bei diesen Tieren führte fettreiche Diät anders als bei den hier untersuchten Menschen zu vermehrter Expression des CB₁-Rezeptors (39). Cavuoto et al. untersuchten in ihrer Studie den Einfluss des CB₁-Rezeptors auf die Expression stoffwechselregulierender Gene in menschlichen Myoblasten. Außerdem verglichen sie Myoblasten übergewichtiger und schlanker Probanden. Wie in der vorliegenden Arbeit sahen sie keinen Unterschied in der CB₁-Rezeptor-Genexpression zwischen schlanken und übergewichtigen Individuen (40). Sie fanden Hinweise auf eine Aktivierung des mitochondrialen oxidativen Stoffwechsels durch CB₁-Blockade mit AM251. Diese Aussage stützt sich jedoch nur auf die Daten der Genexpression. Die Stoffwechselaktivität der Myoblasten wurde nicht gemessen. Insgesamt ist diese Arbeit in ihren Aussagen eher fragwürdig. Nicht zuletzt aufgrund der geringen Zahl von untersuchten Proben (jeweils n = 3) sollten die Daten mit einer gewissen Vorsicht interpretiert werden. Eine gesteigerte Stoffwechselaktivität mit erhöhter Glukoseaufnahme und gesteigertem Sauerstoffverbrauch durch CB₁-Blockade konnten aber auch Liu et al. in Muskelzellen der *ob/ob*-Mäuse nachweisen (39).

In einer weiteren Arbeit zeigten Eckardt et al., dass die Expression des CB₁-Rezeptors bei der Differenzierung humaner Myoblasten zu Myotuben deutlich zunimmt (41). In diesen Zellen führte Anandamid-Inkubation zu einer Hemmung des Insulinsignals im Sinne einer Insulinresistenz. Diese Wirkung wurde durch CB₁-Rezeptor-Blockade mit einem Antagonisten aufgehoben. In der Summe unterstützen diese Daten die Annahme, dass der gewichtsreduzierende Effekt von Rimonabant neben der initialen Hypophagie auch durch die Aktivierung der Thermogenese bewirkt wird. Weiterhin schien die verbesserte Glukoseaufnahme der Muskelzellen unter CB₁-Rezeptor-Blockade positiv auf hyperglykämische Zustände zu wirken, so wie es auch in den RIO-Studien gezeigt werden konnte (24 - 27).

Eine mögliche Interpretation der verringerten Expression des CB₁-Rezeptors im Skelettmuskel durch fettreiche Ernährung, wie sie in den vorliegenden Ergebnissen beschrieben ist, könnte mit der lipogenen Wirkung des CB₁-Rezeptors zusammenhängen. Diese lipogene Wirkung wurde sowohl an Adipozyten als auch Hepatozyten nachgewiesen und betrifft neben der

Fettsäuresynthese auch die Synthese von Glycerol-3-phosphat, einem Baustein der Triglyzeride (23, 33, 35, 37). Möglicherweise schützt sich die Skelettmuskulatur durch verringerte Expression des CB₁-Rezeptors vor nahrungsinduzierter Fetteinlagerung.

4.4 Stärken und Schwächen der ECSF-Studie

Die ECSF-Studie verlief über einen Zeitraum von 14 Monaten. Es konnten die Daten von 17 schlanken und 12 adipösen Studienteilnehmern, die den geforderten Unterschied in der Fettaufnahme zwischen fettarmer und fettreicher Phase von $\geq 11\%$ erreichten, zur Auswertung herangezogen werden. Ursprünglich war eine Zahl von 15 Probanden pro Gruppe vorgesehen. Für eine Berücksichtigung der Geschlechterverteilung (Frauen : Männer 15 : 2 in der Gruppe der Schlanken und 9 : 3 in der Gruppe der Adipösen) waren die Probandenzahlen zu gering. Gründe für den Studienabbruch und den Ausschluss von der Studie sind in Kapitel 3.1 beschrieben. Schwerwiegende Komplikationen traten in keinem Fall auf.

Auch wenn sich die Zahl der erfolgreichen Absolventen der ECSF-Studie durch rückwirkende Probandenausschlüsse oder Studienabbrüche letztlich reduziert hat, steht die Zahl von Teilnehmern, die nach dem Screening oder zu einem späteren Zeitpunkt ausgeschlossen wurden, im Vergleich zu den erfolgreichen Absolventen in einem angemessenen Verhältnis. Auch die Studiendauer von 14 Monaten ist vertretbar, bedenkt man eine Gesamtdauer von 8 Wochen plus Screening-Phase pro Proband. Mögliche Einflussgrößen wie Begleitmedikation konnten auf ein Minimum reduziert werden. Die Einnahme von Bedarfsmedikation und Antikontrazeptiva während der Studie erwiesen sich als unproblematisch, anhand der Messergebnisse konnten keine Auswirkungen der Begleitmedikation erkannt werden. Es wurde eine durchgängige Einnahme der Antikontrazeptiva empfohlen und ein Abstand von mindestens 7 Tagen zwischen letzter Einnahme von Bedarfsmedikamenten und Durchführung der Untersuchungstage V3 und V5 eingehalten.

Die Compliance der Studienteilnehmer stellte neben der Organisation eines planmäßigen Studienablaufes den wichtigsten, aber auch störanfälligsten und unberechenbarsten Aspekt der Studie dar. Zur Kontrolle der Compliance der Probanden hinsichtlich der Einhaltung ihrer Diätvorschriften standen vor allem die von den Probanden selbstständig geführten Ernährungstagebücher zur Verfügung. Problematisch hierbei konnten sein: Vergessen von Einträgen und nachträgliches Ergänzen, Underreporting bei übergewichtigen Probanden oder mangelnde Sorgfalt bei der Bemessung der Nahrungsmengen (65). Grundlage der diätetischen Intervention war die isokalorische Ernährung, um Körpergewicht und Körperzusammensetzung stabil zu halten. Da dieses Ziel mittels apparativer Messungen überprüft werden konnte und

vollständig erreicht wurde, spielten mögliche Abweichungen in den Ernährungstagebüchern hinsichtlich der täglichen Gesamtkalorienmenge keine Rolle.

Schwieriger ist die Bewertung der Fettaufnahme. Die Richtwerte 15%, 30% und 45% sind aus Gründen der Verständlichkeit gewählt worden, um den Probanden begreifbare Zahlen vorzugeben. Da die Probanden ihre Mahlzeiten selbst zusammenstellten, war zu erwarten, dass es Abweichungen von den vorgegebenen Zielen der Fettaufnahme geben würde. Die Empfehlung der Deutschen Gesellschaft für Ernährung zur gesunden Ernährung sieht einen Fettgehalt von 30% an der täglichen Gesamtkalorienmenge vor. Die Werte der Probanden bewegten sich alle in diesem Bereich, die Abweichungen von den empfohlenen 15% bzw. 45% zur Mitte hin stellen also keine Extreme dar, sondern bilden übliche Bereiche der menschlichen Ernährung ab. Auf der Basis der Ernährungstagebücher wurden alle Probanden in die statistische Analyse eingeschlossen, die einen Unterschied in der Fettaufnahme von mindestens 11% erreichten. Unter Berücksichtigung der Ausschlusskriterien ergaben sich Unterschiede in der Fettaufnahme von $23 \pm 1\%$ bei den schlanken und $22 \pm 1\%$ bei den adipösen Probanden. Ein Monitoring der Fettaufnahme mittels Biomarker im Blut wäre von großem Vorteil gewesen, ist derzeit aber in geeigneter Form nicht etabliert. Somit wurden in der vorliegenden Arbeit die biochemischen Surrogate einer verstärkten Fettaufnahme, wie die Erhöhung des Gesamt-Cholesterins, HDL-Cholesterins und hs-CRPs, gemessen. Diese biochemischen Veränderungen wurden von mehreren Diät-Studien als Hinweis auf die biologische Wirksamkeit der fettreichen Ernährung beschrieben (66 - 69). Mit diesen biochemischen Surrogatmarkern ist zwar keine Quantifizierung der Fettaufnahme möglich, aber ihre Änderungen bestätigen, dass ein deutlicher Unterschied in der Fettaufnahme vorgelegen hat. Hervorzuheben ist das Studiendesign der ECSF-Studie mit der isokalorischen Variation der Fettaufnahme und dem Ziel der Gewichtsstabilität. Dies ist eher ungewöhnlich und experimentell und es liegen praktisch keine Vergleichsstudien vor, da in der Regel eine hypokalorische Diät mit dem Ziel der Gewichtsreduktion vorgesehen ist.

Eine der größten Stärken der Studie ist ihre Alltagsnähe. Einerseits bestand diese in der selbständigen Zusammenstellung der Nahrung durch die Probanden und andererseits im Setting der Studie. Die Probanden verblieben in ihrem gewohnten Umfeld und waren nicht dem Stress eines stationären Aufenthaltes unterworfen. Auch wenn die Interventionsstärke dadurch kleiner als geplant ausfiel, bilden diese Daten doch eine lebensnahe Situation ab. Eine Studie zum Endocannabinoid-System des Menschen mit diesem Design und dieser Komplexität gab es zuvor noch nicht. Daten zur fettreichen Ernährung und zur Regulation in verschiedenen Geweben wurden bislang nur im Tiermodell erhoben. Gerade deshalb sind die gewonnenen Erkenntnisse für die Planung weiterführender Studien so bedeutsam. Da fettreiche Ernährung nach den vorliegenden Ergebnissen nicht die Ursache für die Überaktivität des ECS ist, sollten

weitere Studien folgen, die insbesondere den Zusammenhang zwischen Anandamid und Insulin als regulierendem Hormon genauer charakterisieren.

Dem Studiendesign mit seinen diskutierten Unschärfen stehen die hier verwendeten validierten Messmethoden gegenüber. Von den anthropometrischen Messungen sei die Körperzusammensetzung mit dem BodPod[®] erwähnt. Die sogenannte Air Displacement Plethysmography mittels BodPod[®] ist eine etablierte Methode zur Berechnung der Körperzusammensetzung, die weniger störanfällig als die Bioimpedanzanalyse ist (51, 70). Zudem sind die vom Hersteller verwendeten Referenzwerte für die Körperzusammensetzung in den angewendeten Algorithmen vergleichbar mit der Probandenpopulation der ECSF-Studie (junge bis mittelalte Erwachsene). Damit war die Verwendung der BodPod[®]-Daten zum Nachweis der stabilen Körperzusammensetzung in der vorliegenden Studie eine sinnvolle Wahl.

Unter den angewendeten Labormethoden stellt die Bestimmung der mRNA-Mengen in Fettgewebe und Skelettmuskel mittels real-time RT-PCR eine außerordentlich präzise Methode dar. Die Intra- und Interassay-Variationskoeffizienten für die hier untersuchten Gene inklusive des Kontroll-Gens (18S rRNA) wurden mit einer gepoolten Standard-RNA aus Fettgewebe des Menschen ermittelt. Die Werte liegen für alle Gene zwischen 0,8% und 2,2%. Diese Messungen sind im Vergleich zu anderen laborchemischen Methoden so präzise, dass eine detaillierte Diskussion jedes einzelnen Gens nicht notwendig ist. Die Messung von Anandamid erfolgt derzeit nur in wenigen Laboren weltweit, wobei in der Regel eine Flüssigchromatographie gekoppelt an eine Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) angewendet wird. Auffällig sind die großen Schwankungen zwischen verschiedenen Laboren (52, 71), zwischen Publikationen aus dem gleichen Labor (31, 72) und sogar zwischen verschiedenen Studienpopulationen innerhalb einer Publikation (54). Im Labor für Biomarker und Arzneimittelanalytik des Instituts für Klinische Pharmakologie der Medizinischen Hochschule Hannover wurde eine gaschromatographische Methode entwickelt und validiert, die zur Analyse der Messwerte aus der ECSF-Studie verwendet wurde (52). Diese Methode verwendet Interassay-Variationskoeffizienten zwischen 6% und 10% und ist damit ausreichend genau. Die gemessenen Plasmawerte der Probanden für Anandamid lagen zwischen 0,8 und 1,5 nM. Damit stand eine sehr gut validierte und präzise Messmethode für Anandamid zur Verfügung. Die in der Literatur berichteten präanalytischen Vorgaben für die Anandamid-Messung (Kühlung und baldiges Zentrifugieren der Proben nach der Blutentnahme) wurden genau beachtet, um nachträgliche Kontaminationen des Plasmas mit Anandamid aus Blutzellen zu verhindern (73). Kritisch angemerkt werden muss aber, dass aufgrund von methodischen Beschränkungen weder das 2-AG im Plasma noch die Enzymaktivitäten oder der Endocannabinoid-Gehalt in den entnommenen Geweben untersucht werden konnten. Entsprechende Methodenentwicklungen sind ganz klare Ziele für die Zukunft.

Zuletzt soll die statistische Aussagekraft der vorliegenden Daten beurteilt werden. Dazu wurde die primäre (Vergleich von Anandamid bei schlanken und adipösen Probanden) und sekundäre Zielvariable (postprandiale Reduktion von Anandamid nach 1h) dem Prüfplan entsprechend bestimmt. Für den Vergleich schlank ($n = 17$) versus adipös ($n = 12$) ergab sich für Nüchtern-Anandamid $1,22 \pm 0,27$ nM versus $1,57 \pm 0,38$ nM in der Phase mit niedriger Fettaufnahme. Dieser Unterschied wurde bei $\alpha = 0,05$ mit einer Power von 86% festgestellt. Für den Unterschied während der fettreichen Phase ergab sich wegen größerer Schwankung der Messwerte bei adipösen Probanden eine Power von 73%. Für die postprandiale Suppression von Anandamid ergaben sich in der fettarmen Phase $1,22 \pm 0,27$ nM versus $0,81 \pm 0,21$ nM (schlank, Power 99%) und $1,57 \pm 0,38$ nM versus $1,03 \pm 0,27$ nM (adipös, Power 99%); in der fettreichen Phase $1,16 \pm 0,20$ nM versus $0,87 \pm 0,24$ nM (schlank, Power 99%) und $1,49 \pm 0,50$ nM versus $1,36 \pm 0,59$ nM (adipös, Power 21%). Der letzte Vergleich war in keiner Berechnung signifikant. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die dargestellten Ergebnisse zum Plasma-Anandamid sowohl für die Nüchternwerte als auch für die postprandialen Werte bei einer ausreichend großen Probandenzahl erhoben wurden, sodass sich eine starke statistische Aussagekraft ergibt.

5 Zusammenfassung

Endocannabinoide sind Arachidonsäure-Derivate, die von den meisten Zellen des Menschen synthetisiert werden können und Cannabinoid-Rezeptoren aktivieren. Das Endocannabinoid-System ist an vielen Stoffwechselprozessen beteiligt.

In mehreren Studien wurde eine Aktivierung des peripheren Endocannabinoid-Systems bei Adipositas mit erhöhten Endocannabinoid-Konzentrationen im Blut und in verschiedenen Geweben beschrieben. Derzeit gibt es keinen definitiv nachgewiesenen Mechanismus, der die gesteigerte Bioverfügbarkeit der Endocannabinoide bei adipösen Menschen erklärt. Denkbar und durch Daten aus Tiermodellen unterstützt, sind sowohl eine vermehrte Synthese als auch ein verminderter Abbau der Endocannabinoide. In mehreren Studien wurden eine verminderte Expression bzw. Aktivität der Fettsäureamid-Hydrolase (FAAH) sowie erhöhte Konzentrationen von Anandamid in peripheren Geweben bei Adipositas und unter Hochfett-Diät beschrieben. Auf dieser Grundlage ergab sich für die vorliegende Arbeit die Hypothese, dass Übergewicht und fettreiche Ernährung des Menschen zu einer gesteigerten Bioverfügbarkeit von Anandamid führen.

Zur Bearbeitung dieser Hypothese wurde die klinische Studie „Endocannabinoid-System bei fettreicher Ernährung (ECSF)“ durchgeführt, in der der Fettgehalt der Nahrung bei 17 schlanken und 12 übergewichtigen Probanden modifiziert und der daraus resultierende Einfluss auf das Endocannabinoid-System gemessen wurde. Die Intervention umfasste je zwei Wochen mit fettarmer (15% der Nahrungskalorien als Fett) bzw. fettreicher (45% Fett) Diät im randomisierten cross-over Studiendesign, dazwischen lag eine Wash-Out Phase mit 30% Fettgehalt an der täglichen Gesamtkalorienmenge. Zielparameter war die Anandamid-Konzentration im Blut jeweils am Ende der zweiwöchigen fettarmen bzw. fettreichen Ernährungsphase der Probanden. Anandamid wurde basal sowie nach dem Stimulus einer Testmahlzeit im Verlauf gemessen. Außerdem wurden Fett- und Muskelgewebeproben zur Bestimmung der Expression von Genen des Endocannabinoid-Systems jeweils nach der zweiwöchigen fettmodifizierten Diät entnommen.

Die Auswertung der Ernährungstagebücher ergab einen mittleren Unterschied in der Fettaufnahme von $23 \pm 1\%$ bei den schlanken und $22 \pm 1\%$ bei den adipösen Probanden. Analog war die Kohlenhydrataufnahme zwischen den Phasen unterschiedlich. Die Proteinaufnahme war mit durchschnittlich 16% konstant in allen Phasen und Gruppen. Die Körperzusammensetzung aller Probanden blieb während aller Ernährungsphasen konstant. Es konnte bestätigt werden, dass adipöse Menschen im Vergleich zu normalgewichtigen Personen erhöhte Nüchtern-Anandamid-Konzentrationen im Blut aufweisen. Die zweiwöchige fettreiche

oder fettarme Diät wirkte sich aber in beiden Probandengruppen nicht auf die Anandamid-Konzentrationen im Blut aus. Damit wurde die zugrunde liegende Hypothese dieser Arbeit in einem Punkt bestätigt und im zweiten Punkt widerlegt. Die Verlaufsmessungen des Plasma-Anandamids während der fettarmen Testmahlzeit zeigten nach 30 min einen anhaltenden Abfall der Anandamid-Konzentrationen in beiden Probandengruppen. Nach der fettreichen Testmahlzeit zeigte sich tendenziell eine abgeschwächte postprandiale Suppression von Anandamid, die in der 2-way ANOVA mit $p = 0,050$ gerade nicht mehr signifikant war. Die Analyse der $AUC_{0-120 \text{ min}}$ für Anandamid ergab einen signifikanten Unterschied zwischen schlanken und adipösen Personen, der aber ausschließlich auf den höheren Nüchternwerten basierte, denn beide Probandengruppen reagierten gleichermaßen mit einem parallel verlaufenden postprandialen Abfall der Anandamid-Konzentrationen.

Die meisten Gene des Endocannabinoid-Systems werden im Fettgewebe stärker exprimiert als im Skelettmuskel. Im Fettgewebe konnte kein Einfluss des Nahrungsfettgehaltes auf die Expression der ECS-Gene nachgewiesen werden. Das Gen für DAGL- α ist bei den Adipösen stärker, FAAH und MGL sind dagegen schwächer exprimiert. Im Skelettmuskel wurde ein hemmender Einfluss der Hochfett-Diät auf die Expression der CB₁-Rezeptor- und MGL-Gene nachgewiesen. Dieser Einfluss der Ernährung trat sowohl bei den schlanken als auch bei den adipösen Probanden auf.

Die Erhöhung des Nahrungsfettgehaltes ist also weder akut nach der Testmahlzeit noch chronisch nach 2 Wochen Ernährungsumstellung von Bedeutung für die Regulation des Plasma-Anandamids. Somit kann fettreiche Ernährung nicht als direkte Ursache der Dysregulation des ECS bei Adipositas angesehen werden. Die Änderungen der ECS-Genexpression im Fettgewebe deuten auf eine verstärkte Synthese und einen verminderten Endocannabinoid-Abbau bei Adipositas hin. Der fehlende Einfluss des Nahrungsfettgehaltes lässt andere Mechanismen der Dysregulation des ECS bei Adipositas vermuten. So konnte ein statistischer Zusammenhang von Insulin mit der postprandialen Suppression von Anandamid festgestellt werden. In weiterführenden Studien sollte die Rolle des Insulins als negativer Regulator des Plasma-Anandamids genauer untersucht werden. Außerdem sollten die 2-AG-Messungen im Plasma und in den peripheren Geweben (viszerales Fettgewebe, Skelettmuskel, Fettgewebe) weitere Ziele dieser fortführenden Studien sein.

Literaturverzeichnis

- 1 Mecholum R, Gaoni Y: A total synthesis of DL-delta-1-tetrahydrocannabinol, the active constituent of hashish. *J Am Chem Soc.* 1965 Jul 20;87:3273-5.
- 2 Cota D, Marsicano G, Lutz B, et al.: Endogenous cannabinoid system as a modulator of food intake. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003, 27: 289-301
- 3 Pacher P, Batkai S, Kunos G: The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev* 2006, 58:389-462
- 4 Engeli S, Böhnke J, Feldpausch M, et al.: Activation of the peripheral endocannabinoid system in human obesity. *Diabetes* 2005, 54:2838-2843
- 5 Blüher M, Engeli S, Klöting N, et al.: Dysregulation of the peripheral and adipose tissue endocannabinoid system in human abdominal obesity. *Diabetes* 2006, 55:3053-3060
- 6 Matias I, Petrosino S, Racioppi A, et al.: Dysregulation of peripheral endocannabinoid levels in hyperglycemia and obesity: Effect of high fat diets. *Mol Cell Endocrinol* 2008, 286:S66-S78
- 7 Côté M, Matias I, Lemieux I, et al: Circulating endocannabinoid levels, abdominal adiposity and related cardiometabolic risk factors in obese men. *Int J Obes (Lond)* 2007, 31:692-699
- 8 Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI: Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 1990, 346:561-564
- 9 Kaminski NE, Abood ME, Kessler FK, Martin BR, Schatz AR: Identification of a functionally relevant cannabinoid receptor on mouse spleen cells that is involved in cannabinoid-mediated immune modulation. *Mol Pharmacol* 1992, 42:736-742
- 10 Howlett AC, Barth F, Bonner TI, et al.: International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev* 2002, 54:161-202
- 11 Di Marzo V, Bifulco M, De Petrocellis L: The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat Rev Drug Discov* 2004, 3:771-784

- 12 Schusdziarra V, Azad SC, Erdmann J, et al. Das Endocannabinoid-System - Physiologie und klinische Bedeutung. Uni-Med Verlag AG Bremen, 1. Auflage, 2006, ISBN 978-3-89599-987-1, www.uni-med.de
- 13 Wilson RI, Nicoll RA: Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature* 2001, 410:588-592
- 14 Piomelli D: The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci* 2003, 4:873-884
- 15 Puffenbarger RA: Molecular biology of the enzymes that degrade endocannabinoids. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 2005, 4:625-631
- 16 Lichtman AH, Hawkins EG, Griffin G, Cravatt BF: Pharmacological activity of fatty acid amides is regulated, but not mediated, by fatty acid amide hydrolase in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 2002, 302:73-79
- 17 Pertwee RG: Inverse agonism and neutral antagonism at cannabinoid CB₁ receptors. *Life Sci* 2005, 76:1307-1324
- 18 Addy C, Wright H, Van LK, et al.: The acyclic CB₁R inverse agonist taranabant mediates weight loss by increasing energy expenditure and decreasing caloric intake. *Cell Metab* 2008, 7:68-78
- 19 Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW: Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 2006, 443:289-295
- 20 Jamshidi N, Taylor DA: Anandamide administration into the ventromedial hypothalamus stimulates appetite in rats. *Br J Pharmacol* 2001, 134:1151-1154
- 21 Kirkham TC, Williams CM, Fezza F, Di Marzo V: Endocannabinoid levels in rat limbic forebrain and hypothalamus in relation to fasting, feeding and satiation: stimulation of eating by 2-arachidonoyl glycerol. *Br J Pharmacol* 2002, 136:550-557
- 22 Ravinet TC, Delgorge C, Menet C, Arnone M, Soubrie P: CB₁ cannabinoid receptor knockout in mice leads to leanness, resistance to diet-induced obesity and enhanced leptin sensitivity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004, 28:640-648

- 23 Cota D, Marsicano G, Tschöp M, et al.: The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J Clin Invest* 2003, 112:423-431
- 24 Van Gaal LF, Rissanen AM, Scheen AJ, Ziegler O, Rössner S: Effects of the cannabinoid-1 receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients: 1-year experience from the RIO-Europe study. *Lancet* 2005, 365:1389-1397
- 25 Pi-Sunyer FX, Aronne LJ, Heshmati HM, Devin J, Rosenstock J: Effect of rimonabant, a cannabinoid-1 receptor blocker, on weight and cardiometabolic risk factors in overweight or obese patients: RIO-North America: a randomized controlled trial. *JAMA* 2006, 295:761-775
- 26 Després JP, Golay A, Sjöström L: Effects of rimonabant on metabolic risk factors in overweight patients with dyslipidemia. *N Engl J Med* 2005, 353:2121-2134
- 27 Scheen AJ, Finer N, Hollander P, Jensen MD, Van Gaal LF: Efficacy and tolerability of rimonabant in overweight or obese patients with type 2 diabetes: a randomised controlled study. *Lancet* 2006, 368:1660-1672
- 28 Kunos G, Osei-Hyiaman D, Batkai S, Sharkey KA, Makriyannis A: Should peripheral CB₁ cannabinoid receptors be selectively targeted for therapeutic gain? *Trends Pharmacol Sci* 2009, 30: 1-7
- 29 Spoto B, Fezza F, Parlongo G, et al.: Human adipose tissue binds and metabolizes the endocannabinoids anandamide and 2-arachidonoylglycerol. *Biochimie* 2006, 88:1889-1897
- 30 Gonthier MP, Hoareau L, Festy F, et al.: Identification of endocannabinoids and related compounds in human fat cells. *Obesity (Silver Spring)* 2007, 15:837-845
- 31 Matias I, Gonthier MP, Orlando P, et al.: Regulation, function, and dysregulation of endocannabinoids in models of adipose and beta-pancreatic cells and in obesity and hyperglycemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2006, 91:3171-3180
- 32 Gary-Bobo M, Elachouri G, Scatton B, Le Fur G, Oury-Donat F, Bensaid M: The cannabinoid CB₁ receptor antagonist rimonabant (SR141716) inhibits cell proliferation and increases markers of adipocyte maturation in cultured mouse 3T3 F442A preadipocytes. *Mol Pharmacol* 2006, 69:471-478

- 33 Pagano C, Pilon C, Calcagno A, et al.: The endogenous cannabinoid system stimulates glucose uptake in human fat cells via phosphatidylinositol 3-kinase and calcium-dependent mechanisms. *J Clin Endocrinol Metab* 2007, 92:4810-4819
- 34 Tedesco L, Valerio A, Cervino C, et al.: Cannabinoid type 1 receptor blockade promotes mitochondrial biogenesis through endothelial nitric oxide synthase expression in white adipocytes. *Diabetes* 2008, 57:2028-2036
- 35 Osei-Hyiaman D, Depetrillo M, Pacher P, et al.: Endocannabinoid activation at hepatic CB₁ receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *J Clin Invest* 2005, 115:1298-1305
- 36 Gary-Bobo M, Elachouri G, Gallas JF, et al.: Rimonabant reduces obesity-associated hepatic steatosis and features of metabolic syndrome in obese Zucker fa/fa rats. *Hepatology* 2007, 46:122-129
- 37 Osei-Hyiaman D, Liu J, Zhou L, et al.: Hepatic CB₁ receptor is required for development of diet-induced steatosis, dyslipidemia, and insulin and leptin resistance in mice. *J Clin Invest* 2008, 118:3160-3169
- 38 Teixeira-Clerc F, Julien B, Grenard P, et al.: CB₁ cannabinoid receptor antagonism: a new strategy for the treatment of liver fibrosis. *Nat Med* 2006, 12:671-676
- 39 Liu YL, Connoley IP, Wilson CA, Stock MJ: Effects of the cannabinoid CB₁ receptor antagonist SR141716 on oxygen consumption and soleus muscle glucose uptake in Lep(ob)/Lep(ob) mice. *Int J Obes (Lond)* 2005, 29:183-187
- 40 Cavuoto P, McAinch AJ, Hatzinikolas G, Cameron-Smith D, Wittert GA: Effects of cannabinoid receptors on skeletal muscle oxidative pathways. *Mol Cell Endocrinol* 2007, 267:63-69
- 41 Eckardt K, Sell H, Taube A, et al.: Cannabinoid type 1 receptors in human skeletal muscle cells participate in the negative crosstalk between fat and muscle. *Diabetologia* 2009, 52:664-674
- 42 Maccarrone M, Frideri E, Bisogno T, et al.: Up-regulation of the endocannabinoid system in the uterus of leptin knockout (ob/ob) mice and implications for fertility. *Mol Hum Reprod* 2005, 11:21-28

- 43 Di Marzo V, Goparaju SK, Wang L, et al.: Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature* 2001, 410:822-5
- 44 Janiak P, Poirier B, Bidouard JP, et al.: Blockade of cannabinoid CB₁ receptors improves renal function, metabolic profile, and increased survival of obese Zucker rats. *Kidney Int* 2007, 72:1345-1357
- 45 Bensaid M, Gary-Bobo M, Esclangon A, et al.: The cannabinoid CB₁ receptor antagonist SR141716 increases Acrp30 mRNA expression in adipose tissue of obese fa/fa rats and in cultured adipocyte cells. *Mol Pharmacol* 2003, 63:908-914
- 46 Harrold JA, Elliott JC, King PJ, Widdowson PS, Williams G: Down-regulation of cannabinoid-1 CB₁ receptors in specific extrahypothalamic regions of rats with dietary obesity: a role for endogenous cannabinoids in driving appetite for palatable food? *Brain Res* 2002, 952:232-238
- 47 Engeli S: Dysregulation of the endocannabinoid system in obesity. *J Neuroendocrinol* 2008, 20 Suppl 1:110-115
- 48 Müller TD, Reichwald K, Wermter AK, et al.: No evidence for an involvement of variants in the cannabinoid receptor gene (CNR1) in obesity in German children and adolescents. *Mol Genet Metab* 2007, 90:429-434
- 49 Jensen DP, Andreasen CH, Andersen MK, et al.: The functional Pro129Thr variant of the FAAH gene is not associated with various fat accumulation phenotypes in a population-based cohort of 5,801 whites. *J Mol Med* 2007, 85:445-449
- 50 Deutsche Gesellschaft für Ernährung e. V: Evidenzbasierte Leitlinie - Fettkonsum und Prävention ausgewählter ernährungsmitbedingter Krankheiten. November 2006. <http://www.dge.de/leitlinie>
- 51 Dempster P, Aitkens S: A new air displacement method for the determination of human body composition. *Med Sci Sports Exerc* 1995, 27:1692-1697
- 52 Zörner AA, Gutzki FM, Suchy MT, et al.: Targeted stable-isotope dilution GC-MS/MS analysis of the endocannabinoid anandamide and other fatty acid ethanol amides in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2009, 877:2909-2923
- 53 Large V, Arner P: Regulation of lipolysis in humans. Pathophysiological modulation in obesity, diabetes, and hyperlipidaemia. *Diabetes Metab* 1998, 24:409-418

- 54 Di Marzo V, Verrijken A, Hakkarainen A, et al.: Role of insulin as a negative regulator of plasma endocannabinoid levels in obese and nonobese subjects. *Eur J Endocrinol* 2009, 161: 715-722
- 55 Berger A, Crozier G, Bisogno T, Cavaliere P, Innis S, Di Marzo V: Anandamide and diet: inclusion of dietary arachidonate and docosahexaenoate leads to increased brain levels of the corresponding N-acylethanolamines in piglets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, 98:6402-6406
- 56 Matias I, Carta G, Murru E, Petrosino S, Banni S, Di Marzo V: Effect of polyunsaturated fatty acids on endocannabinoid and N-acyl-ethanolamine levels in mouse adipocytes. *Biochim Biophys Acta* 2008, 1781:52-60
- 57 Starowicz KM, Cristino L, Matias I, et al.: Endocannabinoid dysregulation in the pancreas and adipose tissue of mice fed with a high-fat diet. *Obesity (Silver Spring)* 2008, 16:553-565
- 58 Petersen G, Sorensen C, Schmid PC, et al.: Intestinal levels of anandamide and oleoylethanolamide in food-deprived rats are regulated through their precursors. *Biochim Biophys Acta* 2006, 1761:143-150
- 59 Artmann A, Petersen G, Hellgren LI, et al.: Influence of dietary fatty acids on endocannabinoid and N-acylethanolamine levels in rat brain, liver and small intestine. *Biochim Biophys Acta* 2008, 1781:200-212
- 60 Hansen HS, Artmann A: Endocannabinoids and nutrition. *J Neuroendocrinol* 20 Suppl 2008, 1:94-99
- 61 Curat CA, Miranville A, Sengenès C, et al.: From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes. *Diabetes* 2004, 53:1285-1292
- 62 Després JP: Is visceral obesity the cause of the metabolic syndrome? *Ann Med* 2006, 38:52-63
- 63 Murdolo G, Kempf K, Hammarstedt A, Herder C, Smith U, Jansson PA: Insulin differentially modulates the peripheral endocannabinoid system in human subcutaneous abdominal adipose tissue from lean and obese individuals. *J Endocrinol Invest* 2007, 30:RC17-RC21

- 64 D'Eon TM, Pierce KA, Roix JJ, Tyler A, Chen H, Teixeira SR: The role of adipocyte insulin resistance in the pathogenesis of obesity-related elevations in endocannabinoids. *Diabetes* 2008, 57:1262-1268
- 65 Rennie KL, Coward A, Jebb SA: Estimating under-reporting of energy intake in dietary surveys using an individualised method. *Br J Nutr* 2007, 97:1169-1176
- 66 Peairs AT, Rankin JW: Inflammatory response to a high-fat, low-carbohydrate weight loss diet: effect of antioxidants. *Obesity* 2008, 16: 1573-1578
- 67 Tay J, Brinkworth GD, Noakes M, Keogh J, Clifton PM: Metabolic effects of weight loss on a very-low-carbohydrate diet compared with an isocaloric high-carbohydrate diet in abdominally obese subjects. *J Am Coll Cardiol* 2008, 51:59-67
- 68 Rankin JW, Turpyn AD: Low carbohydrate, high fat diet increases C-reactive protein during weight loss. *J Am Coll Nutr* 2007, 26:163-169
- 69 Brinkworth GD, Noakes M, Buckley JD, Keogh JB, Clifton PM: Long-term effects of a very-low-carbohydrate weight loss diet compared with an isocaloric low-fat diet after 12 mo. *Am J Clin Nutr* 2009, 90:23-32
- 70 Bosy-Westphal A, Geisler C, Onur S, et al.: Value of body fat mass vs anthropometric obesity indices in the assessment of metabolic risk factors. *Int J Obes* 2006, 30:475-483
- 71 Di Marzo V, Petrosino S: Endocannabinoids and the regulation of their levels in health and disease. *Curr Opin Lipidol* 2007, 18:129-140
- 72 Di Marzo V, Côté M, Matias I, et al.: Changes in plasma endocannabinoid levels in viscerally obese men following a 1 year lifestyle modification programme and waist circumference reduction: associations with changes in metabolic risk factors. *Diabetologia* 2009, 52:213-217
- 73 Vogeser M, Hauer D, Christina AS, Huber E, Storr M, Schelling G: Release of anandamide from blood cells. *Clin Chem Lab Med* 2006,44:488-491

Anhang

Abkürzungsverzeichnis

AE	unerwünschtes Ereignis (adverse event)
AEA	Anandamid
2-AG	2-Arachidonoyl-Glycerol
AUC	Area Under the Curve
BE	Blutentnahme
BMI	Body Mass Index
CB ₁ -R	Cannabinoid-Rezeptor Typ 1
CB ₂ -R	Cannabinoid-Rezeptor Typ 2
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (complementary deoxyribonucleic acid)
DAGL- α	Diacyl-Glycerol-Lipase α
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung
DIO	diet-induced obesity
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EC	Endocannabinoide
ECS	Endocannabinoid-System
ECSF-Studie	Endocannabinoid-System und Fett-Studie
EP	Ernährungsprotokoll
FAAH	Fettsäureamid-Hydrolase
FU	Follow-up Visite
FVCRC	Franz-Volhard-Centrum für Klinische Forschung
HF	Herzfrequenz
HFD	Hochfett-Diät (high fat diet)
hs-CRP	hoch sensitives C-Reaktives Protein
i. Tr.	in der Trockenmasse
LFD	Niedrigfett-Diät (low fat diet)
LC-MS/MS	Flüssigchromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie (liquid chromatography-tandem mass spectrometry)
MGL	Monoglycerid Lipase
m/z	molekulare Masse des Fragments bei der Messung von Anandamid
NAPE-PLD	N-Arachidonylphosphatidylethanolamin-Phospholipase D
NYHA	New York Heart Association
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)

PUFA	mehrfach ungesättigte Fettsäuren (polyunsaturated fatty acids)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RR	Blutdruck
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
S	Screening-Visite
SAE	schwerwiegendes unerwünschtes Ereignis (serious adverse event)
TIA	transitorische ischämische Attacke
TSH	Thyroidea-stimulierendes Hormon
V1-V5	Verlaufsvisiten
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Quantifizierung der CB ₁ -Rezeptor-mRNA in peripheren Organen des Menschen (4)	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Signaltransduktion des CB ₁ -Rezeptors	3
Abbildung 3: Retrograde Signaltransduktion durch CB ₁ -Rezeptoren im Gehirn	4
Abbildung 4: Synthese von Anandamid und 2-AG	5
Abbildung 5: Quantifizierung der FAAH-mRNA in peripheren Organen des Menschen (4)	6
Abbildung 6: Metabolische Effekte des Endocannabinoid-Systems	7
Abbildung 7: Indirekte Kalorimetrie – Probandin unter der Atemhaube	18
Abbildung 8: BodPod [®] zur Messung der Körperzusammensetzung	20
Abbildung 9: Fettgewebebiopsie	21
Abbildung 10: Muskelbiopsie.....	22
Abbildung 11: Darstellung der Fragmentierung von d ₀ -AEA und deuteriertem d ₄ -AEA nach gaschromatischer Trennung und Tandem-Massenspektrometrie (51).....	28
Abbildung 12: Entwicklung der Probandenzahlen im Studienverlauf	32
Abbildung 13: Ergebnisse der Ernährungstagebücher.....	33
Abbildung 14: Alter und anthropometrische Daten.....	34
Abbildung 15: Lipidparameter	35
Abbildung 16: hs-CRP	35
Abbildung 17: Glukose, Insulin und freie Fettsäuren nach der Testmahlzeit	37
Abbildung 18: Anandamid nüchtern und nach der Testmahlzeit.....	38
Abbildung 19: Expression der ECS-Gene im subkutanen Fettgewebe.....	40
Abbildung 20: Expression der ECS-Gene im M. vastus lateralis	41

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Visitenschema und Inhalte der einzelnen Untersuchungstage	15
Tabelle 2:	Verteilung der Makronährstoffe auf die tägliche Kalorienaufnahme.....	16
Tabelle 3:	Expressionsniveau der ECS-Gene in Fettgewebe und Skelettmuskel unter fettarmer Diät	39

Erklärung

Ich, Anne-Christin Lehmann, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Einfluss des Fettgehalts der Nahrung auf die Aktivität des Endocannabinoid-Systems gesunder schlanker und adipöser Menschen“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Tagungsbeiträge

Engeli S, **Lehmann AC**, Böhnke J, Tsikas D, Jordan J: Influence of dietary fat on circulating ADMA in human subjects. European Society of Hypertension, Juni 2009, Mailand (Poster).

Engeli S, **Lehmann AC**, Böhnke J, Janke J, Gorzelniak K, Wiesner S, Luft FC, Zörner AA, Tsikas D, Jordan J: Influence of a high fat diet on the endocannabinoid system in lean and obese healthy subjects. International Cannabinoid Research Society, Juli 2009, St. Charles, IL, USA (Vortrag).

Lehmann AC, Böhnke J, Haas V, Strauß A, Boschmann M, Zörner AA, Tsikas D, Jordan J, Engeli S: Einfluss der Fettaufnahme auf das Endocannabinoid Anandamid. Deutsche Adipositas-Gesellschaft, November 2009, Berlin (Poster).

Sell H, **Lehmann AC**, Böhnke J, Haas V, Strauß A, Jordan J, Eckel J, Engeli S: Fettreiche Diät beeinflusst die Plasmakonzentrationen des neuen Adipokins Chemerin. Deutsche Adipositas-Gesellschaft, November 2009, Berlin (Vortrag).

Danksagung

Prof. Jens Jordan möchte ich für die Vergabe dieser Promotion danken und für die Möglichkeit, die zugrundeliegende ECSF-Studie in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen. Herzlichen Dank für das entgegengebrachte Vertrauen in meine Arbeit.

Ein ganz besonderer Dank gilt Dr. Stefan Engeli für seine Engelsgeduld, die gute Betreuung, vielfache Unterstützung bei der Verwirklichung dieser anspruchsvollen Forschungsarbeit auch über die örtliche Distanz der letzten Phase hinweg. Danke für diese Jahre der konstruktiven und herzlichen Zusammenarbeit.

Großer Dank gebührt dem gesamten Team der ehemaligen Arbeitsgruppe des Franz-Volhard-Centrums für Klinische Forschung und ganz besonders Anke Strauß, Grit Stoffels für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Studie. Danke für die vielfältige Unterstützung und geduldige Anleitung sowie die besonders angenehme Arbeitsatmosphäre.

Weiterhin möchte ich Jana Böhnke und Verena Haas vielmals für die Mitbetreuung und Schulung der Probanden, die Erstellung und Auswertung der Ernährungstagebücher sowie die Berechnung der unendlich vielen Probandendaten danken.

Herzlichen Dank möchte ich an die Mitarbeiter des Adipozytenlabors der Franz-Volhard-Klinik Berlin Buch, Dr. Jürgen Jahnke, Kerstin Gorzelnjak und Henning Damm, richten, die unermüdlich an der Probenmessung arbeiteten und mir die Genexpressionsdaten aus dem Fettgewebe und Skelettmuskel als Grundlage dieser Arbeit großzügig zur Verfügung stellten. Ihnen kommt ein entscheidender Anteil am Gelingen dieser Arbeit zu. Vielen Dank für die gute Zusammenarbeit.

Weiterhin bedanke ich mich beim Leiter des Labors für Biomarker und Arzneimittelanalytik der Medizinischen Hochschule Hannover, Dr. Dimitrios Tsikas, der die Anandamid-Bestimmung in seinem Labor ermöglichte sowie Alexander Zörner für die Durchführung der Anandamid-Assays. Nicht zuletzt danke ich allen Probanden für Ihr Vertrauen und Ihre Mitarbeit an der Studie. Vielen Dank für das Durchhaltevermögen und das rege Interesse.

Ich möchte mich bei meinen Eltern und Großeltern für die treue Begleitung auf meinem Weg, die unerschütterliche Zuversicht und die vielen motivierenden Worte bedanken.